

Deutsches Herzzentrum München
des Freistaates Bayern
Klinik an der Technischen Universität München
(Univ.- Prof. Dr. A. Schömig)

**Der GNB3 C825T Polymorphismus und das Risiko an koronarer Herzerkrankung
zu erkranken**

Yasmin Margarete Schusterschitz

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur
Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.- Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.- Doz. Dr. N. C. W. von Beckerath

2. Univ.- Prof. Dr. St. Massberg

Die Dissertation wurde am 01.12.2008 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch
die Fakultät für Medizin am 18.03.2009 angenommen.

Inhalt

	Verzeichnis der Abkürzungen	S. 3
1	Einleitung	
	1.1 Koronare Herzerkrankung	S. 5
	1.2 Heterotrimere G-Proteine	S. 8
	1.3 Wirkungsweise der G-Proteine	S. 10
	1.4 Der molekulare Aufbau der G-Protein β -Untereinheit	S. 12
	1.5 Der GNB3 C825T Polymorphismus	S. 15
	1.5.1 Definition: genetischer Polymorphismus	S. 15
	1.5.2 Einfluss des GNB3 C825T Polymorphismus auf die Proteinstruktur	S. 15
	1.6 Der GNB3 C825T Polymorphismus und Risikofaktoren für KHK	S. 17
	1.7 Der GNB3 C825T Polymorphismus und Arteriosklerose	S. 18
2	Problemstellung	S. 19
3	Material und Methoden	
	3.1 Patienten- und Kontrollgruppe	S. 20
	3.2 Definitionen	S. 20
	3.3 Blutabnahme und DNA-Extraktion	S. 21
	3.4 Genotypisierung	
	3.4.1 Polymerasekettenreaktion	S. 22
	3.4.2 Genotypisierung durch allelspezifische Restriktionsfragmente	S. 23
	3.4.3 Genotypisierung mittels TaqMan-Assay	S. 25
	3.5 Statistische Analyse	S. 29
4	Ergebnisse	
	4.1 Patientencharakteristika	S. 30

4.2	Genotypverteilungen	S. 31
4.3	Assoziation zwischen T-Allel und KHK	S. 32
5	Diskussion	
5.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	S. 34
5.2	Der GNB3 C825T Polymorphismus und koronare Herzerkrankung	S. 35
5.3	Der GNB3 C825T Polymorphismus und arterielle Hypertonie	S. 37
5.4	Der GNB3 C825T Polymorphismus und BMI	S. 39
5.5	Der GNB3 C825T Polymorphismus und Arteriosklerose sowie Vasokonstriktion	S. 41
5.6	Zukunftsperspektiven	S. 43
6	Zusammenfassung	S. 45
7	Literaturverzeichnis	S. 47
8	Danksagung	S. 56

Verzeichnis der Abkürzungen

KHK	koronare Herzerkrankung
art.	arteriell
RCA	Arteria coronaria dextra
RIA	Ramus interventrikularis anterior
RCX	Ramus circumflexus
G- Proteine	Guanin Nukleotid bindende Proteine
AC	Adenylatcyclase
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PLC β 2,3	Phospholipase-C-Isoenzyme
DG	1,2- Diacylglycerol
IP3	Inositol-1,4,5-triphosphat
PIP	Phosphatidylinositol-4,5-phosphat
PDK 1	Phosphatidylinositol Dependent Protein Kinase
PKC	Proteinkinase C
IP3- R	IP3- Rezeptor
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
kDA	kilo Dalton
GH	Glycin-Histidin
WD	Tryptophan-Asparagin
A	Adenin
T	Thymin
G	Guanin
C	Cytosin
BMI	Body mass index

PAF	Plättchenaktivierungsfaktor
mg	Milligramm
dl	Deziliter
kg	Kilogramm
m	Meter
ml	Milliliter
µl	Mykroliter
upm	Umdrehungen pro Minute
DNA	Desoxyribonukleinsäure
PCR	Polymerasekettenreaktion
bp	Basenpaare
GE	Gefäßkrankung
OR	Odds Ratio
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
D	Deletion
I	Insertion
mV	Millivolt
SNP	single nucleotide polymorphism

1 Einleitung

1.1 Koronare Herzerkrankung

Als koronare Herzerkrankung (KHK) bezeichnet man die durch Arteriosklerose bedingte Lumeneinengung der Koronararterien und deren Folgen für die Herzfunktion. Stenosen führen zu einem verminderten Koronarfluss, es kommt zur Koronarinsuffizienz, dadurch kann eine Myokardinsuffizienz ausgelöst werden [8, S.907]. In den Industrieländern ist die KHK die häufigste Todesursache, bei Männern im mittleren Lebensalter mit einer Prävalenz bis zu 30%. Bei der Geschlechtsverteilung sind Männer momentan noch circa dreimal so oft betroffen wie Frauen, es zeichnet sich jedoch ab, dass das Verhältnis sich annähert, da zunehmend mehr Frauen an KHK erkranken. In den westlichen Industrieländern zeigt sich eine Inzidenz von circa 300-400 Infarkten/100000 Einwohner/Jahr. Es zeigen sich deutliche geographische Unterschiede, so ist die Inzidenz in Japan oder in mediterranen Ländern deutlich geringer [39].

Angina pectoris, Myokardinfarkt, Herzrhythmusstörungen (einschließlich plötzlicher Herztod) und Herzinsuffizienz zählen zu den klinischen Manifestationen der KHK. Für eine Reihe von Faktoren, die in einem statistischen Zusammenhang mit der koronaren Herzerkrankung stehen, ist ein kausaler Zusammenhang wahrscheinlich. Sie können unter dem Gesichtspunkt, ob eine Intervention die Prognose günstig beeinflusst, in vier Kategorien eingeteilt werden [23, S.1].

1. Risikofaktoren, deren Korrektur die Prognose nachweislich günstig beeinflusst:

Nikotinkonsum, erhöhtes LDL- Cholesterin, fettreiche Kost, art. Hypertonie,
thrombogene Faktoren

2. Risikofaktoren, deren Korrektur die Prognose wahrscheinlich günstig beeinflusst:

Körperliche Inaktivität, niedriges HDL- Cholesterin, Diabetes mellitus, erhöhte

Triglyceride, Adipositas, Menopause, Stress und psychosoziale Faktoren

3. Risikofaktoren, deren Beachtung und Korrektur die Prognose möglicherweise günstig beeinflusst, der

Nachweis jedoch noch aussteht:

Lipoprotein(a), Homocystein, oxydativer Stress, Alkoholkarenz, erhöhte

Entzündungsparameter, chronische Chlamydien- oder Helicobacter pylori Infektionen

4. nicht beeinflussbare Risikofaktoren:

Alter, männliches Geschlecht, Familienanamnese mit frühzeitiger Manifestation einer

KHK, niedriger sozioökonomischer Status

Die Myokardischämie lässt sich auf einen erhöhten Koronarwiderstand, myokardiale Faktoren sowie extrakoronare Faktoren zurückführen.

Der Koronarwiderstand selbst setzt sich aus drei Komponenten zusammen:

1. Proximale Komponente (Widerstand der epikardialen Leitungsgefäße)
2. Distale Komponente (Widerstand der intramyokardialen Arteriolen)
3. Extravasale Komponente (systolische Gefäßkompression infolge intramyokardialer Drucksteigerung) [15, S.188]

Zu 95% ist eine Makroangiopathie der großen epikardialen Koronarien verantwortlich für den erhöhten Widerstand, aber auch Koronarspasmen und Mikroangiopathien tragen zur Entstehung bei [22, S.845]. Als myokardiale Faktoren zählen die Herzhypertrophie, ein erhöhter enddiastolischer Ventrikeldruck bei Insuffizienz sowie Hypertonie und Tachykardie [1, S.966; 47, S.883-884]. Die extrakoronaren Faktoren sind vor allem ein erhöhter Sauerstoffbedarf oder aber eine erniedrigtes Sauerstoffangebot [23, S.1].

Die Durchblutung des Herzens erfolgt transmural, vom Epikard ausgehend in Richtung Endokard. Drei große Arterien sind für die regelgerechte Durchblutung verantwortlich: die rechte Koronararterie (RCA), der Ramus interventricularis anterior (RIA) und der Ramus circumflexus (RCX). RIA und RCX werden aus der linken Koronararterie gespeist. Demgemäß spricht man bei einer Stenose von über 50% des Durchmessers der einzelnen Gefäße (RCA, RIA, RCX) von einer 1-,2- oder 3- Gefäßerkrankung. Prädilektionsorte für arteriosklerotische Veränderungen stellen die Bifurkationen der stammnahen großen Gefäße dar [15, S.188].

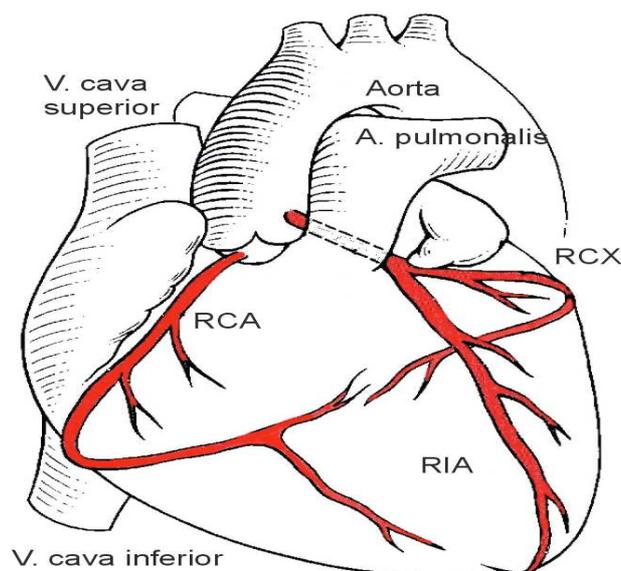


Abb. 1: schematische Darstellung der arteriellen Gefäßversorgung des Herzens; Arteria coronaria dextra (RCA) und Arteria coronaria sinistra, welche sich in den Ramus interventricularis anterior (RIA) und den Ramus circumflexus (RCX) aufteilt

1.2 Heterotrimere G- Proteine

Heterotrimere G-Proteine (=Guanin Nukleotid bindende Proteine) sind Vermittler zwischen zellwandständigen heptahelikalen Rezeptoren oder Rezeptoren mit intrinsischer Tyrosinkinase Aktivität und intrazellulären Effektoren („second messengers“), wie zum Beispiel Ionenkanälen oder Enzymen [2, S. 523; 36, S.27]. G-Protein gekoppelte Rezeptoren sind langsame Rezeptoren. Im menschlichen Körper gibt es circa 100 verschiedene G-Protein gekoppelte Rezeptoren, nimmt man die der Riechschleimhaut dazu, weit über 1000 [7, S. 169; 42, S.1159]. Rezeptor, G-Protein und Effektor stellen die auf jeden Fall notwendigen Anteile für eine erfolgreiche Signalübertragung via G-Proteinen dar [42, S.1160].

Transmitter → Rezeptor → G-Protein → Effektor

Die Rezeptoren bestehen aus einer Peptidkette, die siebenmal die Zellmembran durchzieht. Daher bezeichnet man sie als heptahelikale Rezeptoren. Während die Peptidkette die Zellmembran durchzieht, bildet sie Taschen, in welchen dann kleine Liganden, wie zum Beispiel Noradrenalin, an den Rezeptor binden können [10, S.117].

G-Proteine bestehen als Heterotrimere aus drei Untereinheiten, der α -Untereinheit, der β -Untereinheit und der γ -Untereinheit, wobei es mindestens 16 α -, 5 β - und 12 γ -Isoformen gibt [28, S.206; 36, S.27; 42, S.1163]. Hier lässt sich schon die Vielzahl der unterschiedlichen Kombinationsmöglichkeiten der Untereinheiten erkennen um ein Heterotrimer zu bilden. Die β - und γ -Untereinheit werden jedoch funktionell als Monomer angesehen, da sie unter physiologischen Bedingungen nicht voneinander dissoziieren [36, S.27].

Nach strukturellen Ähnlichkeiten der α -Untereinheit lassen sich G-Proteine weiterhin in vier verschiedene Familien aufteilen: G_s , G_i , G_q und $G_{12/13}$ [42, S.1163].

Durch die Rezeptoraktivierung und die Möglichkeit der G-Proteine als Relaismoleküle, das heißt durch ihre Untereinheiten G_α und $G_{\beta\gamma}$ jeweils Informationen auf separate Effektoren zu übertragen, lassen sich zahlreiche zellspezifische Signalkaskaden steuern. Bei Aktivierung der G-Proteine folgt jedoch jede Signalkaskade dem ihr vorbestimmten Weg. So lässt sich sagen:

bestimmter Rezeptor \rightarrow bestimmtes G-Protein \rightarrow bestimmter Effektor [7, S.179-180; 10, S.118; 36, S.27].

Beispielsweise stimuliert ein β -adrenerger Rezeptor das G_s -Protein, dieses wiederum stimuliert die Adenylatzyklase. Wird aber ein α_2 -Rezeptor erregt, stimuliert er das G_i -Protein, das inhibierend auf die Adenylatzyklase wirkt. Aber auch der Transmitter kann mehrere Rezeptoren erregen. Wie Abbildung 2 zeigt, haben auch G-Proteine die Möglichkeit auf mehrere Effektoren zu wirken. G_i kann sowohl hemmend auf die Adenylatzyklase oder Ca^{2+} -Kanäle wirken als auch positiv auf K-Kanäle.

Hervorzuheben ist auch die irreversible Hemmung des G_i -Proteins durch das Pertussistoxin [7, S.178-190; 42, S.1164].

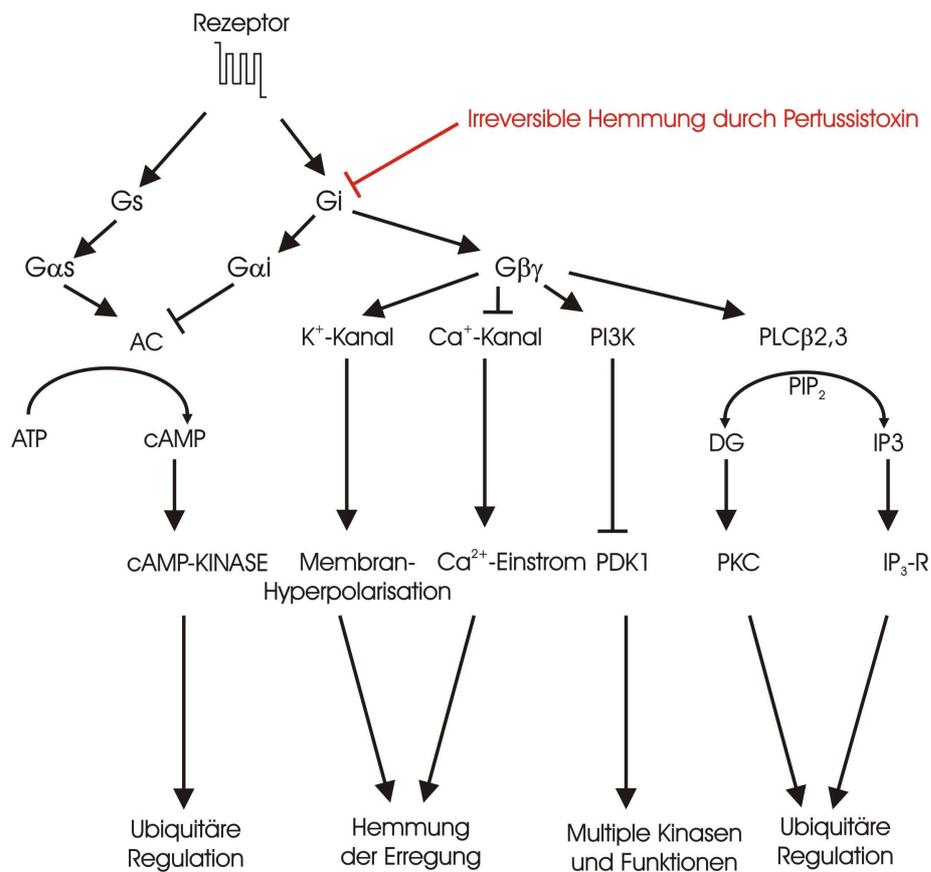


Abb. 2: Wirkungsmöglichkeiten der G-Proteine (zelluläre Regulation) G-Protein: G_s: stimulierendes G-Protein; G_i: inhibitorisches G-Protein; Effektoren: AC: Adenylatcyclase; PI3K: Phosphatidylinositol-3-Kinase; PLCβ2,3: Phospholipase-C-Isoenzyme; Second messenger: DG: 1,2- Diacylglycerol; IP3: Inositol-1,4,5-triphosphat; PIP: Phosphatidylinositol-4,5-phosphat PDK 1: Phosphatidylinositol dependent protein kinase; PKC : Proteinkinase C; IP3-R: IP3- Rezeptor, modifiziert nach [10, S. 20]

1.3 Wirkungsweise der G-Proteine

Im inaktiven Zustand bestehen G-Proteine aus einer α -, β -, γ -Einheit, wobei an die α -Untereinheit auch noch GDP, Guanosindiphosphat, gekoppelt ist [42, S.1160].

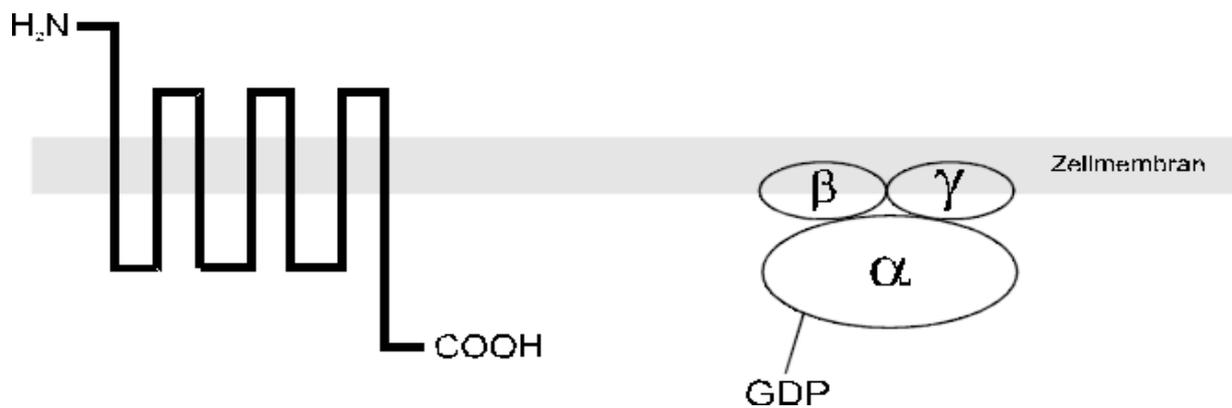


Abb. 3: Darstellung der G- Proteine im inaktiven Zustand: zellwandständiger Rezeptor und das G- Protein mit der α-, β-, γ-Einheit; an die α- Einheit ist GDP gekoppelt

Bindet ein Ligand an den Rezeptor, so kommt es zur Konformationsänderung des dazugehörigen G- Proteins. Durch die Konformationsänderung wird die Loslösung GDPs von Gα katalysiert, GDP wird durch GTP, Guanosintriphosphat ersetzt [7, S.169; 42, S.1160].

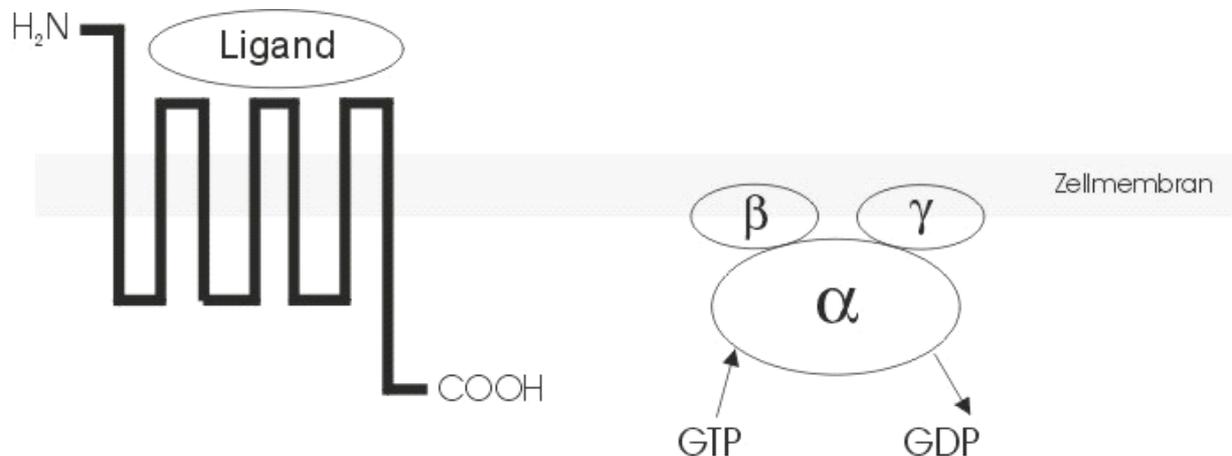


Abb. 4: Konformationsänderung der G-Proteine: durch Bindung eines Liganden an den Rezeptor wird an der α- Untereinheit GDP durch GTP ausgetauscht

GTP vermindert die Affinität von $G\alpha$ zur $\beta\gamma$ -Untereinheit und sie dissoziieren voneinander. Diese Affinitätsminderung verhindert den sofortigen Wiederauschluss von $G\alpha$ mit $G\beta\gamma$, die Untereinheiten müssen mit anderen Proteinen reagieren. Sie können eine Reihe von Effektoren aktivieren, wie zum Beispiel Ionenkanäle, MAP- Kinase und Phospholipase C. Die Aktivierung der Effektoren führt dann zur entsprechenden zellulären Antwort, wie zum Beispiel Muskelkontraktion oder Hormonsekretion [7, S. 169; 42, S.1160].

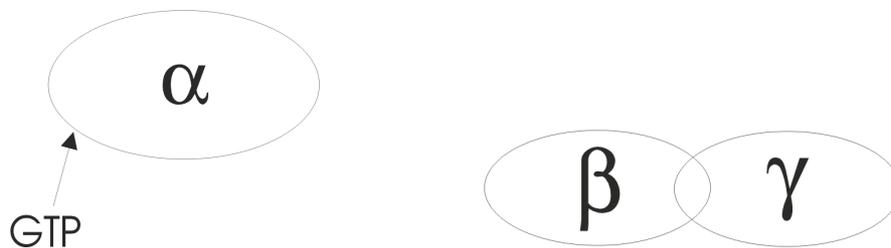


Abb. 5: Dissoziation der G-Proteine: durch die Bindung von GTP an die α - Untereinheit dissoziieren die α - und die $\beta\gamma$ - Untereinheit voneinander; dadurch können die Effektoren aktiviert und eine zelluläre Antwort ausgelöst werden

Beendet wird dieser Zyklus durch Aktivierung der GTPase, sie hydrolisiert GTP zu GDP. Die $G\alpha$ -Untereinheit und die $G\beta\gamma$ -Untereinheit lagern sich wieder an, die G-Proteine kehren in ihren inaktiven Zustand zurück und sind nun wieder für einen neuen Aktivierungszyklus bereit [36, S.27; 42, S.1160].

1.4 Der molekulare Aufbau der G-Protein β -Untereinheit

Die β -Untereinheiten von G-Proteinen haben ein Molekulargewicht von 35 – 39 kDa. Sie setzen sich strukturell aus zwei Teilen zusammen, aus einem N-terminalen Ende, einer α -Helix aus circa 20 Aminosäuren und dem „Remainder of the Molecule“, dem Rest des Moleküls. Der „Remainder“ ist eine sich siebenmal wiederholende Sequenz („WD- Repeat“), welche aber nicht spezifisch für $G\beta$ -Proteine ist, sondern in noch etwa 40 anderen Proteinen, so genannten WD-Proteinen, zu finden ist. Die

Sequenz des „WD-Repeats“ beginnt mit Glycin-Histidin (GH), sie endet mit Tryptophan-Asparagin (WD). Zwischen GH und WD befindet sich die variable Region, die unterschiedliche Längen aufweisen kann [7, S.170].

Strukturell bildet der „WD-Repeat“ einen Ring mit klassischer Propellerstruktur. Der Propeller wird von sieben Flügeln gebildet, wobei jeder dieser Flügel aus vier gedrehten antiparallelen β -Ketten besteht und dem C-terminalen Ende des Proteins entspricht. Die Ringstruktur wird durch den so genannten „Velcro Snap“-Klettverschluss- in Flügel Nummer sieben erhalten, eine der 4 β - Ketten entstammt dem N- terminalen Ende.



Abb. 6: Proteinstruktur von G- Protein β - Untereinheiten: Türkis dargestellt $G\beta$, dunkelblau $G\gamma$. Propellerförmige Ringstruktur mit 7 Flügeln, welche aus jeweils 4 gedrehten β - Ketten bestehen, modifiziert nach [20, S.2087]

$G\alpha$ kommuniziert mit $G\beta$ über die Flügel eins, zwei und drei. $G\gamma$ hat hier eine Sonderstellung. Das N-terminale Ende von $G\gamma$ steht in Verbindung mit dem N- terminalen Ende von $G\beta$. Des Weiteren besteht

eine feste Verbindung von $G\gamma$ und $G\beta$ über die Flügel 5,6,7. Auf Grund dieser Verbindung wird $G\beta\gamma$ funktionell als Monomer angesehen, da es nur bei Denaturierung des Proteins zum Lösen der Verbindung kommt [7, S.160 ff; 20, S. 2086-2087].

Zu erwähnen ist auch noch die Region II in der $G\alpha$ -Untereinheit. Bei allen α -Untereinheiten zeigt sich dort die Konformationsänderung, wenn GDP durch GTP ersetzt wird [7, S.172].

1.5 Der GNB3 C825T Polymorphismus

1.5.1 Definition: genetischer Polymorphismus

Ein genetischer Polymorphismus liegt vor, wenn unterschiedliche Allele gleichzeitig an einem Genort in einer Population vorkommen. Das seltene Allel muss jedoch in mindestens 1% der Fälle in dieser Population vorkommen [45].

1.5.2 Einfluss des GNB3 C825T Polymorphismus auf die Proteinstruktur

Das Gen für die G Protein $\beta 3$ Untereinheit (GNB3) liegt auf Chromosom 12p13. Es besteht aus elf Exons, wobei das Start- Codon ATG auf Exon 3, das Stop- Codon TGA auf Exon 11 zu finden ist (A= Adenin, T= Thymin, G= Guanin, C= Cytosin) [34, S.1301]. Exon 10 von GNB3 weist eine häufige genetische Variante, einen Polymorphismus auf. Cytosin kann hier in Position 825 durch Thymidin ersetzt werden (C825T), woraus sich jedoch keine Änderung der Aminosäuresequenz (Serin) ergibt [34, S.1301].

Der Austausch von Cytosin durch Thymidin bewirkt jedoch ein alternatives Spleißen des Gens, dadurch entsteht eine neue Variante der $\beta 3$ -Untereinheit. Diese wird $G\beta 3_s$ genannt. Durch das alternative

Spleißen kommt es zum Verlust der Nukleotide 498-620 von Exon 9, $G\beta_3_s$ ist um 41 Aminosäuren kürzer als $G\beta_3$ [37, S.45; 4, S.882].

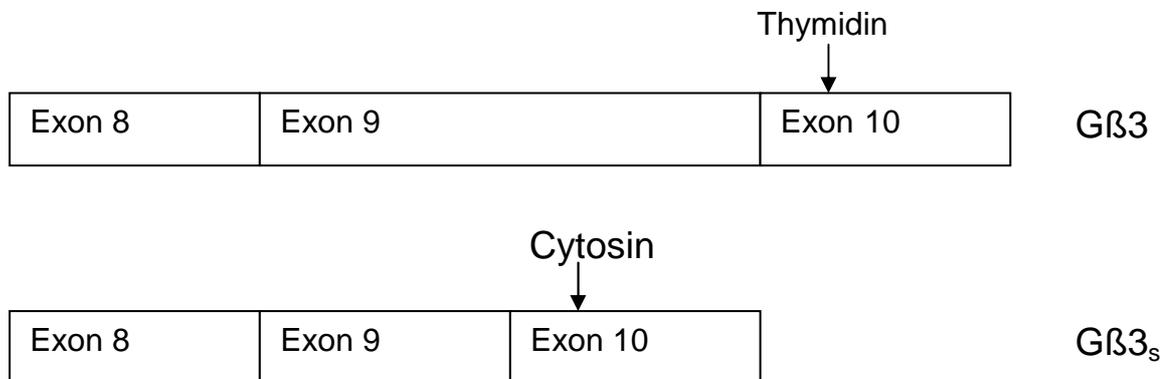


Abb. 7: Einfluss des GNB3 Polymorphismus auf die Proteinstruktur: durch alternatives Spleißen, hervorgerufen durch den Austausch von Cytosin durch Thymidin, entsteht eine neue Variante der G- Protein β_3 Untereinheit, $G\beta_3_s$

Strukturell äußert sich das Fehlen der Aminosäuren in der Deletion eines Propellerflügels: WD repeat 3 verliert die letzten vier Aminosäuren, WD repeat 4 besteht nur noch aus den letzten fünf Aminosäuren [36, S.28; 37, S.46].

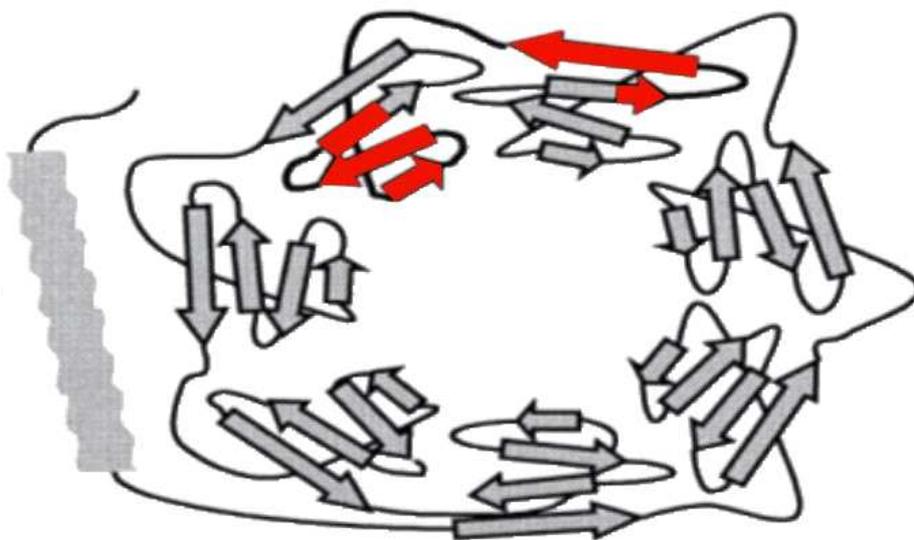


Abb. 8: Modell der Proteinstruktur von $G\beta_3$. Rot dargestellt die Anteile des Proteins, die der veränderten Untereinheit $G\beta_3_s$ fehlen, aus [34, S.1302].

Trotz dieses Verlustes ist das entsprechende G₁-Protein weiterhin funktionsfähig, lediglich eine gesteigerte Aktivierbarkeit ist zu beobachten [1, S.2; 36, S.28].

Evolutionsgeschichtlich stellte der Polymorphismus zu Zeiten des Jagens und Sammelns wohl einen Überlebensvorteil dar. Heute noch findet man ihn gehäuft bei den alten Völkern wie den Buschmännern, den australischen Aborigines und den Farbigen Afrikas. Bei diesen wird auch ein gehäuftes Auftreten von Hypertonie und Adipositas gefunden, sofern sie ihren ursprünglichen Lebensstil aufgeben und einen westlichen mit einem Überangebot an Kalorien, Fetten und Salzen annehmen. Der Anteil von T-Allel Trägern in Mitteleuropa beläuft sich auf ungefähr 30 Prozent [34, S.1302; 35, S.1925].

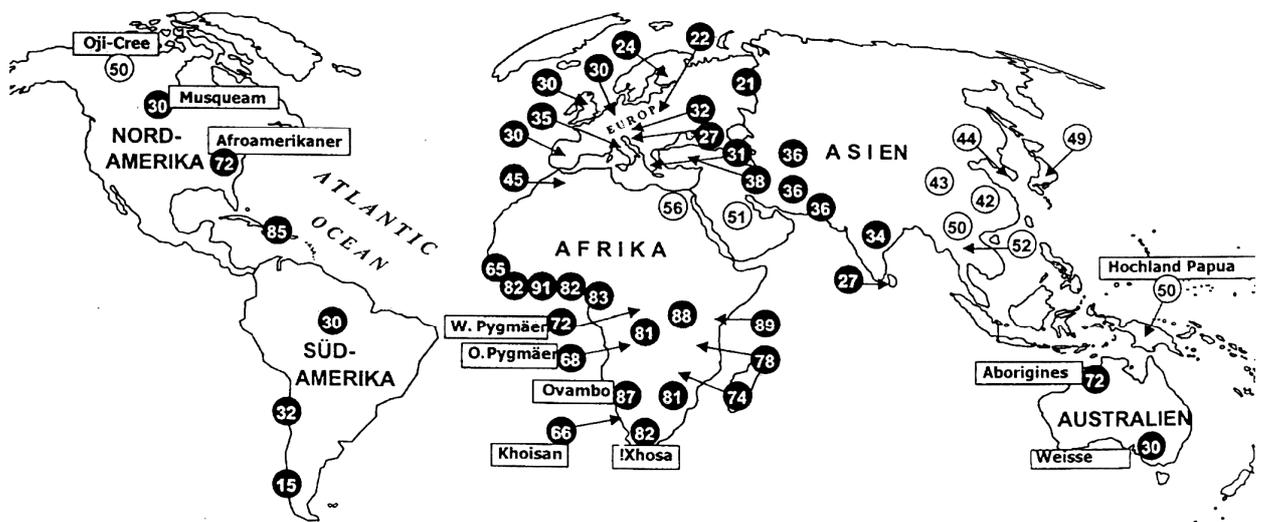


Abb. 9: Anteil von T- Allel Trägern in verschiedenen Regionen der Welt. Der höchste Anteil von T- Allel Trägern findet sich in Schwarzafrika und bei den Ureinwohnern Australiens, aus [35, S.1927].

1.6 Der GNB3 C825T Polymorphismus und Risikofaktoren für KHK

G-Proteine sind in unserem Körper an zahlreichen Vorgängen beteiligt, so auch an etlichen Prozessen die zur Entstehung einer KHK beitragen.

Als Erstes ist wohl eine der häufigsten Zivilisationskrankheiten der westlichen Welt, nämlich die Adipositas zu nennen. G_i-Proteine sind maßgeblich an der Entstehung von Fettzellen beteiligt. Siffert et al beschrieben ein gehäuftes Auftreten des T825-Allels bei Patienten mit einem Body mass index (BMI) von mehr als 29,9 kg/m². In dieser Studie hatten homozygote T- Allel Träger (Genotyp TT) gegenüber Nichtträgern (Genotyp CC) ein zwei- bis dreifach erhöhtes Risiko an Adipositas zu erkranken [36, S.30]. Die Hyperlipidämie zählt zu den Hauptrisikofaktoren eine KHK zu entwickeln. Erhöhtes Gesamt-Cholesterin im Serum, unter Berücksichtigung eines geschlechtsspezifischen Unterschiedes, wurde mit dem GNB3 825T- Allel in Verbindung gebracht (Gesamtcholesterin (mmol/l) Männer: CC=4,24±0,16; CT und TT= 4,78±0,08; P< 0,05; Frauen: CC=5,17±0,10; CT und TT=5,48±0,05; P< 0,5) [18, S.143].

Ein weiterer wichtiger Gesichtspunkt ist der Zusammenhang von GNB3 825T und der Hypertonie. Die arterielle Hypertonie zählt ebenfalls zu den Hauptrisikofaktoren.

Ein zweifach erhöhtes Hypertonierisiko homozygoter T-Allel Träger gegenüber homozygoten C-Allel Trägern wurde bei Farbigen und Kaukasiern beobachtet [4, S.1094; 37, S.47]. Das vermehrte Auftreten der Hypertonie im Zusammenhang mit dem T- Allel von GNB3 ist, wohl auf Grund des verschiedenen genetischen Hintergrundes, nicht bei allen Völkern zu beobachten. So zeigen Japaner keine Erhöhung des Blutdruckes, Oji-Cree Kanadier sogar einen erniedrigten systolischen Blutdruck, wenn sie Träger des T825- Allels sind [14, S.688; 18, S.142].

Es gibt zwei Hypothesen zur Entstehung der Assoziation der essentiellen Hypertonie mit dem GNB3 C825T Polymorphismus [34, S.1299].

Durch die gesteigerte Aktivierbarkeit der G_i-Proteine bei T-Allel Trägern kommt es zur erhöhten Aktivität des Na⁺/H⁺-Austauschers in der Niere. Daraus resultiert eine vermehrte Na⁺-Rückresorption in den Tubuli, folglich kommt es zur Volumenexpansion, die dann zur Hypertonie führt.

Die zweite, wahrscheinlichere These besagt, dass durch die erhöhte Aktivität des Na⁺/H⁺-Austauschers die Zellen während der Proliferationsphase vor einer Azidose bewahrt werden. Die Hypertonie wird in diesem Fall durch Hypertrophie der glatten Muskelzellen in der Arterienwand verursacht [34, S.1299 ff; 37, S.47].

Auch die low-renin Hypertonie ist mit dem T825- Allel vergesellschaftet. Hier ist der diastolische Blutdruck erhöht, Renin Werte sind erniedrigt und das Aldosteron/Renin Verhältnis ist zugunsten des Aldosterons verschoben. Das vermehrte Aldosteron ist durch eine Hochregulierung der Angiotensin II-Rezeptoren mit vermehrter Aldosteronausschüttung zu erklären, welches ebenso zur Hypertrophie der glatten Muskelzellen der Arterienwände führen kann [9, S.116; 32, S.1301-1302].

1.7 Der GNB3 C825T Polymorphismus und Arteriosklerose

Eine proliferative Wirkung auf glatte Muskelzellen wird den G_i-vermittelten Vasokonstriktoren Angiotensin II, Epinephrin, Thrombin und dem Plättchenaktivierungsfaktor PAF zugeschrieben, welche die Entstehung von Arteriosklerose fördern [34, S.1298; 37, S.47]. Epinephrin, Angiotensin II und Thrombin wirken über den G_i gekoppelten M₂-Rezeptor der glatten Muskelzellen der Gefäße und führen zudem zu einer verstärkten Vasokonstriktion [22, S. 846; 37, S.47].

Als Agonist für die Plättchenaktivierung ist Thrombin im Zusammenspiel mit Kollagen für die primäre Plättchenadhäsion verantwortlich, Thromboxan A₂ und ADP für die Vergrößerung eines Thrombus, welche ebenfalls G_i vermittelt wirken [6, S.218].

Plättchenaktivierung und die Entstehung von Plaques sind frühe Ereignisse bei der Entwicklung der Arteriosklerose. Bei T- Allel Trägern zeigte sich eine signifikant gesteigerte Plättchenaktivierung [25, S.200] und eine gesteigerte Plättchenadhäsion nach Epinephringabe [11, S.279].

Auch entzündliche Prozesse spielen in der Pathogenese der Arteriosklerose eine wichtige Rolle [9, S.115]. Viedt et al fanden nach Stimulation von glatten Gefäßmuskelzellen mit dem Lysekomplex des Komplementsystems (C5b-9) eine erhöhte Transkription und Produktion des proinflammatorischen Interleukin-6. Die Interleukin-6 Ausschüttung ist wohl G_i- Protein abhängig, da sie sich durch Pertussistoxin hemmen lässt. Ob die T- Allel Trägerschaft signifikant zu einer vermehrten Interleukin-6 Produktion und Ausschüttung führt wurde in dieser Arbeit nicht gesondert behandelt [41, S.2370].

In diesem Zusammenhang ist ebenfalls eine verstärkte T- Zell Antwort bei T-Allel Trägern zu erwähnen. T- Allel Träger haben eine erhöhte Neutrophilen und Lymphozyten Chemotaxis, sowie eine erhöhte proliferative Antwort - im Sinne einer erhöhten Lymphozyten Aktivierung und Proliferation - auf Interleukin-2 Stimulus [21, S.83] und fördern somit den Entzündungsprozess, der das Risiko für eine Arteriosklerose erhöht [9, S.115; 38, S.609].

2 Problemstellung

Lässt sich eine signifikante Assoziation des T825 Allels mit dem Risiko, an einer koronaren Herzerkrankung zu erkranken, nachweisen? Kann man den Schweregrad der KHK mit dem T825 Allel in Verbindung bringen?

3 Methoden

3.1 Patienten- und Kontrollgruppe

Der GNB3 C825T Genotyp wurde bei 998 konsekutiven Patienten mit stabiler oder instabiler Angina pectoris und signifikanten Koronararterienstenosen bestimmt. Die Kontrollgruppe bestand aus 340 Patienten, bei welchen angiographisch Koronararterienstenosen ausgeschlossen worden waren.

Die KHK- Gruppe, wie auch die Kontrollgruppe wurden zur selben Zeit gewonnen und waren bezüglich des Alters und Geschlechts in etwa vergleichbar.

3.2 Definitionen

Die Diagnose der koronaren Herzerkrankung ist angiographisch gestellt worden. Hierbei musste eine Stenose von 50% oder mehr in mindestens einer der großen Koronarien oder deren Hauptästen vorliegen. War nur ein Gefäß mit einer Stenose $\geq 50\%$ betroffen, lag definitionsgemäß eine 1-Gefäßkrankung vor, bei zwei Gefäßen eine 2-Gefäßkrankung und entsprechend bei drei Gefäßen eine 3-Gefäßkrankung. Ein Patient galt als KHK frei, wenn angiographisch Stenosen von mehr als 10% ausgeschlossen worden waren.

Die Patienten galten als Diabetiker, wenn sie insulinpflichtig waren oder orale Antidiabetika einnahmen. Waren sie diätätisch eingestellt, zählten die Kriterien der WHO: ein erhöhter Nüchternblutzucker bei mindestens zwei Entnahmen (≥ 126 mg/dl im Plasma) und/oder ein positiver Glucosetoleranztest (75 Gramm Glucose per os \rightarrow Glucosewert über 200 mg/dl nach 2 Stunden). Der body mass index berechnete sich wie folgt: Körpergewicht (kg) / Körpergröße² (m). Als Raucher wurden alle Patienten eingestuft, die angaben, in den vergangenen sechs Monaten regelmäßig geraucht zu haben. Arterielle Hypertonie bestand, wenn bei mindestens zwei unabhängigen Messungen ein systolischer Blutdruckwert von ≥ 140 mmHg und/oder ein diastolischer Wert von ≥ 90 mmHg gemessen wurde.

Eine Hypercholesterinämie wurde per definitionem ab einem Gesamtcholesterin von 240 mg/dl diagnostiziert. Die Daten zu den kardiovaskulären Risikofaktoren wurden den Patientenakten entnommen oder während des stationären Aufenthaltes erhoben.

3.3 Blutabnahme und DNA- Extraktion

Nach vorheriger Aufklärung der Patienten und schriftlicher Einwilligung wurde EDTA-Blut vor der Herzkatheteruntersuchung aus der arteriellen Schleuse entnommen und bei - 21°Celsius eingefroren. Die DNA-Extraktion aus Leukozyten erfolgte wie nachfolgend beschrieben mit Hilfe des QIAamp Blood Kit, Quiagen, Hilden aus 200 µl Vollblut.

In ein 1,5 ml Eppendorfgefäß wurden 20 µl Protease, 200 µl Blut und 200 µl AL Puffer pipettiert. Der Puffer wurde zuvor 15 Sekunden geschüttelt. Anschließend inkubierte der Mix für zehn Minuten bei 56 Grad Celsius. Um Tropfen, die sich während des Inkubierens am Deckel des Gefäßes gebildet hatten, zu entfernen wurde der Mix zentrifugiert. Daraufhin pipettierte man 200 µl Ethanol (96-100%) dazu und schüttelte für 15 Sekunden. Im nächsten Schritt wurden 620 µl des Mix in eine Säule mit Auffanggefäß gegeben und für eine Minute bei 8000 upm (Umdrehungen pro Minute) abzentrifugiert. Das Auffanggefäß wurde ausgetauscht, 500 µl AW 1 Puffer dazupipettiert und für eine Minute bei 8000 upm zentrifugiert. Das Auffanggefäß wurde erneut ausgetauscht. 500 µl AW 2 Puffer wurden hinzupipettiert und man ließ es für drei Minuten bei 13000 upm zentrifugieren. 200 µl AE Puffer wurden dazupipettiert, die Säule in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gestellt und es wurde eine Minute bei Raumtemperatur stehengelassen. Im letzten Schritt wurde der Mix bei 8000 upm für eine Minute zentrifugiert. Die gelöste DNA wurde erneut bei – 21° Celsius eingefroren und stand zur Genotypisierung zur Verfügung.

3.4 Genotypisierung

3.4.1 Polymerasekettenreaktion

Die PCR ist eine Methode, um einen bestimmten Abschnitt der DNA (Amplikon) zu vervielfältigen. Sie ist ein zyklisches Verfahren, bei dem sich während jedes Zyklus die Anzahl der DNA Kopien verdoppelt. Zunächst werden die beiden Stränge der DNA durch Erhitzen auf 95° getrennt. Dann wird die Temperatur in dem PCR Gerät auf eine Temperatur heruntergefahren, bei der sich die vorher ausgewählten Primer spezifisch an die Enden des zu vervielfältigenden DNA-Segmentes anlagern (Annealing). Die Polymerase katalysiert die Verlängerung der Primer, wobei die in einem Puffer gelösten Nucleotide als Bausteine dienen (Extension). Durch die Verdoppelung der DNA-Kopien mit jedem Zyklus kommt es im Verlauf der PCR zu einem exponentiellen Anstieg von Kopien.

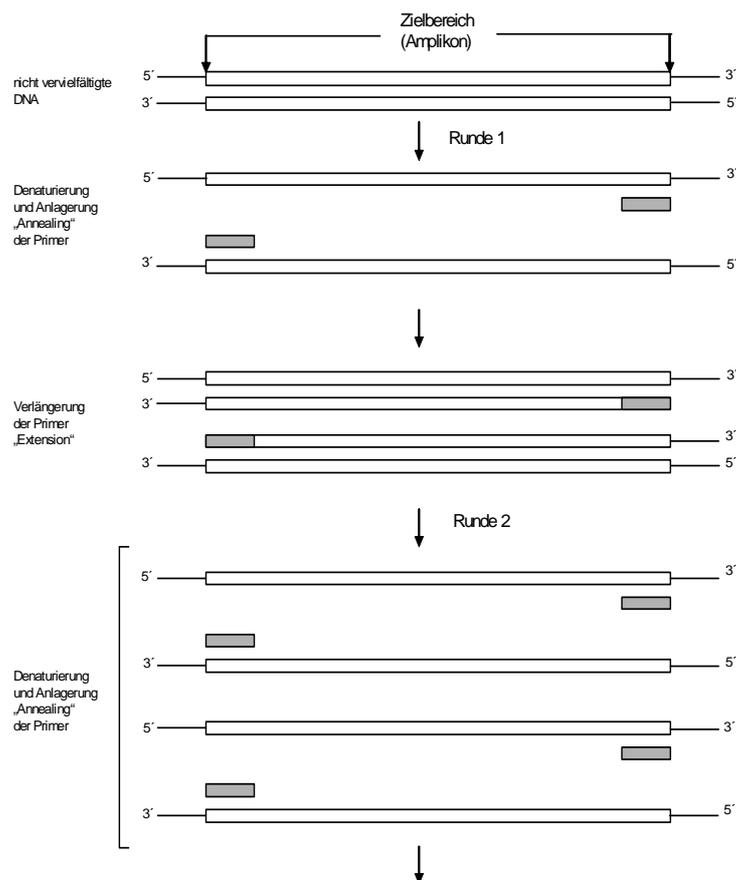


Abb.10: Schema zur Arbeitsweise der PCR. Jeder Zyklus beinhaltet die Schritte Denaturierung, Anlagern der Primer und Primerverlängerung. Mit jedem Zyklus verdoppelt sich die Anzahl der DNA-Kopien.

3.4.2 Genotypisierung durch allelspezifische Restriktionsfragmente

Aus peripherem Vollblut wurde DNA mit hohem spezifischem Molekulargewicht nach der beschriebenen Methode isoliert. Zur Bestimmung des CC, CT und TT Genotyps, nach Amplifikation der DNA durch die PCR, sind allelspezifische Restriktionsenzyme, Restriktionsendonukleasen, verwendet worden. Es wurde ein 344-bp großes Stück des GNB3-Gens mittels PCR amplifiziert; benutzte Primer sind in nachfolgender Tabelle aufgelistet. Um eine Kontrollreaktion für den Verdau durch das Enzym zu haben, wählten wir die Primer für die PCR so, dass das Amplikon außer im Bereich des polymorphen DNA-Abschnitts eine weitere Schnittstelle für das verwendete Enzym enthielt.

Primersequenzen	
Vorwärts- Primer	5' TGA CCC ACT TGC CAC CCG TGC 3'
Rückwärts- Primer	5' GAG AGT CCG AAA TGG GAG CTG A 3'

Tabelle 1: Nukleotidsequenzen der verwandten Vorwärts- und Rückwärts- Primer

Die Auswahl der passenden Enzyme erfolgte unter anderem mit der Rebase Webseite (<http://rebase.neb.com>). Die gewählte Restriktionsendonuklease BseDI (MBI Fermentas) verdaute die amplifizierte DNA und spaltete das C825-Allel spezifische PCR-Produkt in drei Fragmente (152 bp, 104 bp, 88 bp), das T825-Allel spezifische in zwei (256 bp, 88 bp).

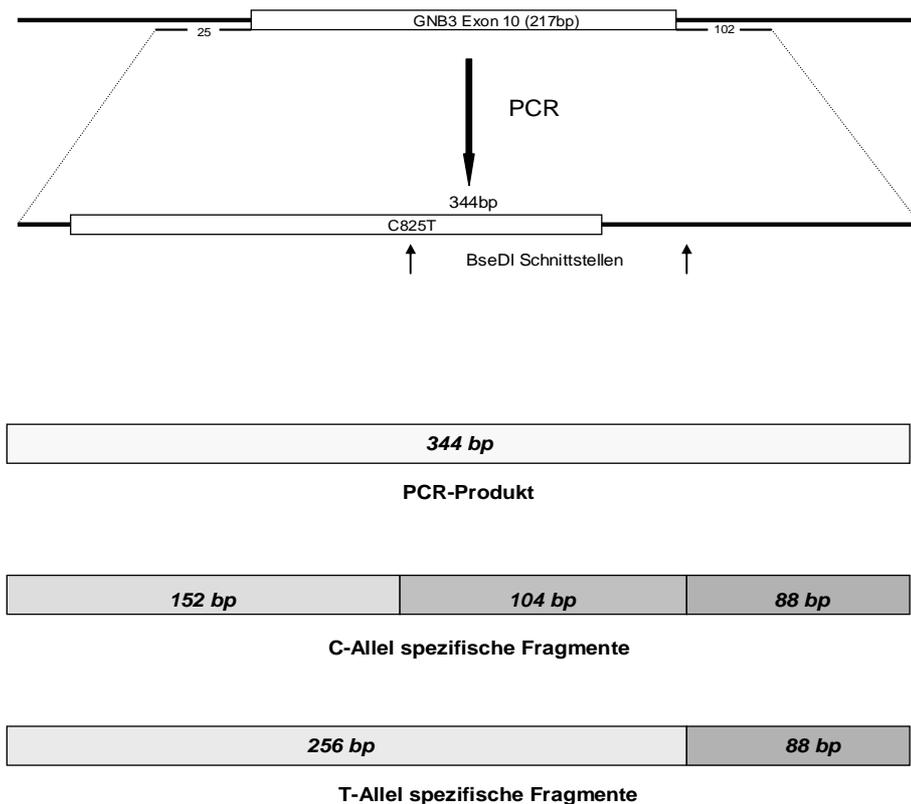


Abb. 11: Bestimmung des GNB3 C825T: Bestimmung des Genotyps durch allelspezifischen Verdau eines Exon 10 beinhaltenden 344 bp großen PCR-Produktes durch BseDI

Zur Auftrennung der Fragmente und zur Auswertung wurde ein 6% Polyacrylamid- Gel (Invitrogen, Groningen, Niederlande) in einer senkrecht konfigurierten Elektrophoresekammer mit dem PCR-Produkt beladen. Nach Anfärbung der DNA mit Ethidiumbromid wurden die Restriktionsfragmente und zur Kontrolle jeweils ein unverdautes PCR- Produkt durch Vergleich ihrer Banden mit den Banden des DNA- Größenmarkers unter UV- Licht (312 Nanometer) identifiziert. Die Photodokumentation der Gele erfolgte mit einem digitalen System (GelPrint 2000i, MWG- Biotech, Ebersberg). Abbildung 11 zeigt schematisch die Bildung der Restriktionsenzymfragmente durch Schneiden des Enzyms BseDI und Abbildung 12 die Photodokumentation eines entsprechenden Gels.

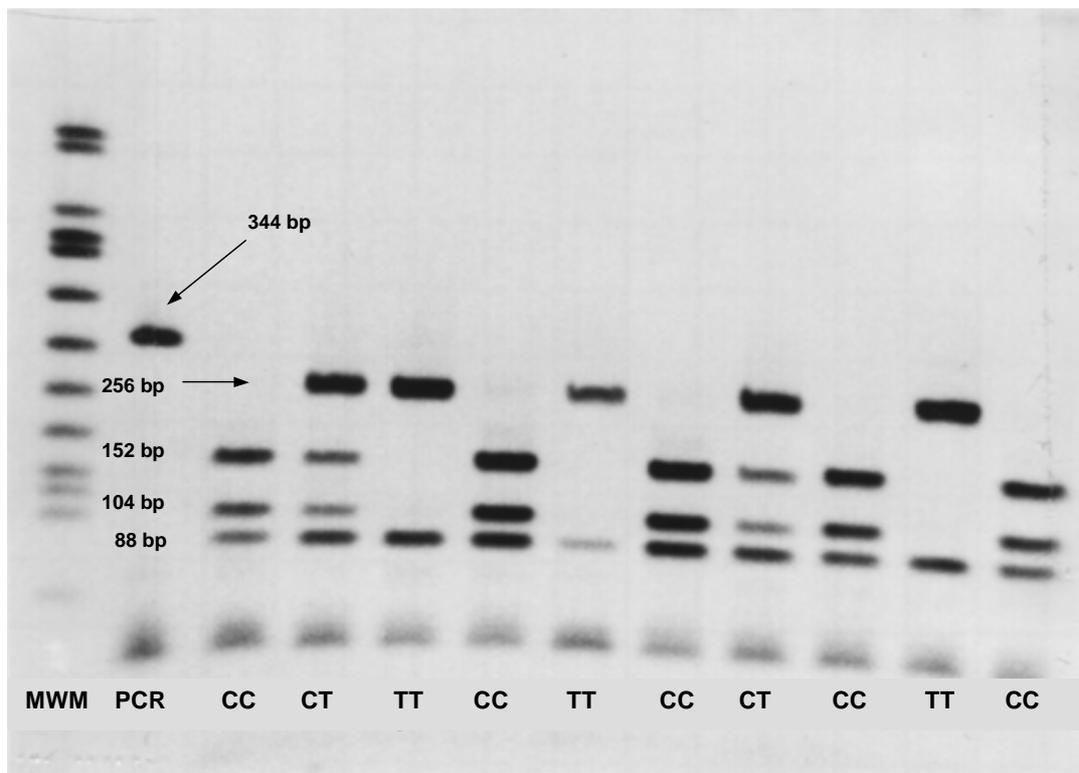


Abb.12: Photodokumentation eines Elektrophoresegels zur Bestimmung des GNB3 C825T Genotyps: ganz links befinden sich die Banden des Molekulargewichtsmarkers, anschließend die Bande des unverdauten Amplifikons und folgend die allelspezifischen Fragmente von 10 Patienten

3.4.3 Genotypisierung mittels TaqMan-Assay

Bei weitem die meisten Genotypen wurden mit dem TaqMan- Verfahren bestimmt. Die für das Verfahren notwendige Standard DNA von homozygoten T- und C- Allel Trägern wurde mittels PCR und Restriktionsenzymverdau genotypisiert. Das TaqMan- Verfahren bietet die Möglichkeit die Amplifikation und die Genotypenbestimmung in einem Schritt durchzuführen. Hierbei sind zwei Primer, Vorwärts-Primer und Rückwärts- Primer, jeweils zwei fluorogene Sonden, bestehend aus Oligonukleotiden, pro Allel und die TaqMan-Polymerase (5' → 3'- Exonuklease Aktivität) nötig. Die Sonden sind am 5'-Ende mit dem fluoreszierendem Reporter- Farbstoff FAM (6- Carboxyfluoreszin) oder VIC (Applied Biosystems, Weiterstadt) kovalent verbunden, am 3'-Ende mit dem signalauslöschenden Quencher-Farbstoff TAMRA (6- Carboxytetramethylrhodamin). Durch Markierung der DNA- Sonden mit

Fluoreszenzfarbstoffen kann das Schneiden der Sonde aufgrund des Fluoreszenzsignals nachgewiesen werden. Schneiden der fluorogenen Sonde während der PCR führt zur räumlichen Trennung der beiden Farbstoffe und damit zu einer Erhöhung der Fluoreszenz des Reporter- Farbstoffes. Die Bestimmung des Genotyps erfolgt durch Auswertung der allelspezifischen Fluoreszenzsignale.

Die benötigten Primer und Sonden wurden mit der Primer Express Software ausgesucht (Applied Biosystems, Weiterstadt). Die Nukleotidsequenzen der Primer und Sonden sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Primersequenzen	
Vorwärts- Primer	5' TTC TCC CAC GAG AGC ATC ATC T 3'
Rückwärts- Primer	5' GTC GTC GTA GCC AGC GAA TAG TA 3'
Sondensequenzen	
825C-Allel	5' CAT CAC GTC C GT GGC CTT CTC C 3'
825T-Allel	5' CAT CAC GTC T GT GGC CTT CTC CCT 3'

Tabelle 2: Nukleotidsequenzen Primer und Sonden; Polymorphe Basen sind farbig dargestellt

Die Sonden für das C- Allel werden am 5`-Ende mit fluoreszierendem Farbstoff FAM markiert, die Sonden für das T-Allel am 5`- Ende mit VIC. Am 3`-Ende der Sonden befindet sich der signalauslöschende Quencher-Farbstoff TAMRA.

Weitere nötige Bestandteile zur Herstellung des Reaktionsmixes stellen der TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Weiterstadt) und deionisiertes Wasser dar. Nachfolgende Tabelle zeigt die Zusammensetzung des für die Amplifikation notwendigen Mix.

Bestandteile	Menge (in μl)
H ₂ O (deionisiert)	746
Universal Master Mix	1100
Vorwärts- Primer	33
Rückwärts- Primer	33
FAM-markierte Sonde	44
VIC-markierte Sonde	44

Tabelle 3: Bestandteile des Reaktionsmixes für das TaqMan Verfahren zur Bestimmung des Genotyps

Dieser Mix wurde zu je 20 μ l pro Loch mit jeweils 2 μ l der entsprechenden DNA-Probe in die 96- Loch Platte pipettiert.

Die ersten acht Löcher der Platte beinhalteten Wasser als Kontrolle, dann folgten je acht Löcher mit C- und T-Allel Standards, im Anschluss 72 Patientenproben. Die PCR selbst startete mit 50° C für zwei Minuten, dann 95° C für zehn Minuten. Anschließend folgten 40 Zyklen der Denaturierung bei 95° C für 15 Sekunden und Annealing/Extension bei 62° C für eine Minute. Für die PCR wurden folgende Prozessoren verwendet: GeneAmp System PCR 9600, GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Weiterstadt) und ABI Prism 7700 Sequence Detection Systems (Applied Biosystems, Weiterstadt). Nach Beendigung des PCR Laufes wurden die Patientenproben im ABI Prism 7700 Sequence Detection System analysiert und die allelspezifischen Fluoreszenzsignale ausgewertet. Durch die Nähe des Reporter-Farbstoffes zum Quencher-Farbstoff verringert sich bei komplett erhaltener Sonde die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffes auf dem Boden eines Energietransfers nach Förster. Lagert sich die Sonde allerdings komplementär zum DNA-Strang an, spaltet die TaqMan-Polymerase den Reporter-Farbstoff von der Sonde ab. Die Trennung des Reporter-Farbstoffes vom Quencher-Farbstoff äußert sich, wie bereits beschrieben, in einem erhöhten Fluoreszenzsignal des Reporter-Farbstoffes. Die Sonden werden nun von dem entsprechenden DNA-Abschnitt entfernt und

die PCR wird mit dem oben beschriebenen Muster fortgesetzt. Die Intensität des gemessenen Fluoreszenzsignals kann einem bestimmten Allel, beziehungsweise Genotyp zugeordnet werden und somit ist die Auswertung sofort möglich.

Ein isolierter Anstieg der FAM- Fluoreszenz entsprach Homozygotie für das C-Allel, ein isolierter Anstieg der VIC- Fluoreszenz Homozygotie für das T-Allel. Beim Genotyp CT kam es zum Anstieg beider Fluoreszenzsignale.

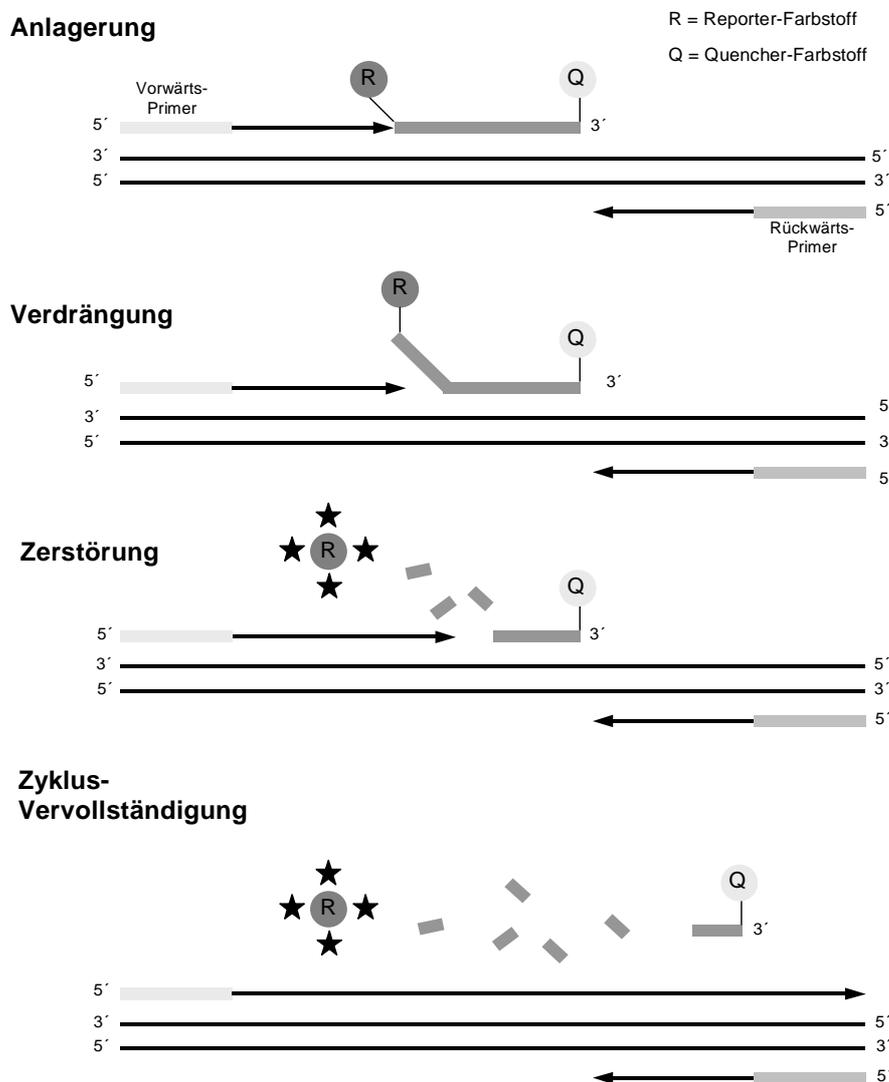


Abb. 13: Schematische Darstellung der Arbeitsweise des TaqMan-Assays: dargestellt sind Anlagerung, Verdrängung und Zerstörung der sich allelspezifisch angelagerten DNA-Sonde sowie Vervollständigung des PCR-Zyklus.

Die Ergebnisse wurden stichprobenartig kontrolliert, bei 20 % der Patienten ist erneut DNA aus Blutproben isoliert und der Genotyp bestimmt worden. Die Auswahl der Stichproben erfolgte, ohne Informationen zu diesen, rein zufällig.

3.5 Statistische Analyse

Bei dieser Arbeit bestand der Hauptteil der Analyse darin, die Genotypverteilung der KHK-Gruppe mit der Genotypverteilung der Kontrollgruppe zu vergleichen. Diskrete Variablen wurden in Prozent ausgedrückt und mit dem χ^2 -Test verglichen. Kontinuierliche Variablen wurden mit dem ungepaarten zweiseitigen t-Test verglichen. Für die Risikoanalyse wurde jeweils der Odds Ratio und das 95% Konfidenzintervall berechnet. Die Überprüfung der Gültigkeit des Hardy-Weinberg-Gesetzes in der Kontrollgruppe erfolgte mit einem speziell für diesen Zweck entwickeltem Programm [44].

Die unabhängige Beziehung zwischen T-Allel und koronarer Herzerkrankung wurde unter Einbeziehung der beeinflussenden Faktoren mit Hilfe von einer multivariaten Analyse geprüft. Der Trendtest und die logistische Regression für ordinal skalierte Merkmale („Ordinal Logistic Regression“) wurde benutzt um den Zusammenhang zwischen T-Allel und dem Schweregrad der KHK zu überprüfen. Eine statistische Signifikanz wurde für P-Werte $<0,05$ akzeptiert.

4 Ergebnisse

4.1 Patientencharakteristika

Die Patientencharakteristika wie auch die Genotypverteilung der KHK- Gruppe und der Kontrollgruppe sind in Tabelle 4 vergleichend dargestellt.

	KHK- Gruppe n=998	Kontrollgruppe n= 340	P- Werte
Alter (in Jahren)	64,9±10,1	63,4±10,3	0,01
Frauen	241(24,1)	84 (24,7)	0,84
arterielle Hypertonie	707 (70,8)	206 (60,6)	< 0,001
Diabetes mellitus	202 (20,2)	35 (10,3)	<0,0001
Raucher	246 (24,6)	64 (18,8)	0,03
Hypercholesterinämie	457 (45,8)	138 (40,6)	0,10
BMI (kg/m²)	27,1±5,2	26,6±3,2	0,04
C825T Genotyp			0,07
CC	443 (44,4)	175 (51,5)	
CT	455 (45,6)	138 (40,6)	
TT	100 (10,0)	27 (7,9)	

Tabelle 4: Verteilung der Risikofaktoren: Alter in Mittelwerten ± Standardabweichung, Risikofaktoren und Genotypverteilung in absolute Zahlen, in Klammern angegebene Werte entsprechen Prozenten

Bezüglich des Alters (KHK: 64,9±10,1 vs. Kontrolle: 63,4±10,3; P= 0,01) und des Geschlechts (Frauenanteil KHK: 24,1 % vs. Kontrolle: 24,7 %; P= 0,84) waren die Gruppen in etwa vergleichbar.

Die Verteilung der Patientencharakteristika zeigte, wie zu erwarten, eine erhöhte Prävalenz kardiovaskulärer Risikofaktoren bei der KHK-Gruppe, verglichen mit der Kontrollgruppe.

So waren in der KHK-Gruppe (20,2 %) etwa doppelt so viele Diabetiker zu finden wie in der Kontrollgruppe (10,3 %). In der KHK- Gruppe zeigte sich ein um 10% erhöhter Anteil an Patienten mit arterieller Hypertonie (KHK: 70,8 % vs. Kontrolle: 60,6 %). Als weitere Faktoren sind Zigarettenrauchen (KHK: 24,6 % vs. Kontrolle: 18,8 %; P= 0,03) und Hypercholesterinämie (KHK: 45,8 % vs. Kontrolle:

40,6 %; P= 0,10) zu nennen. Der BMI war im Durchschnitt in der KHK-Gruppe höher als in der Kontrollgruppe (KHK: 27,1±5,2 vs. Kontrolle: 26,6±3,2; P= 0,04).

4.2 Genotypverteilungen

Die Genotypverteilung war wie folgt:

- Kontrollgruppe: **CC** 51,5 % (n = 175); **CT** 40,6 % (n = 138); **TT** 7,9 % (n = 27)
- KHK-Gruppe: **CC** 44,4 % (n = 443); **CT** 45,6 % (n = 455); **TT** 10,0 % (n = 100)

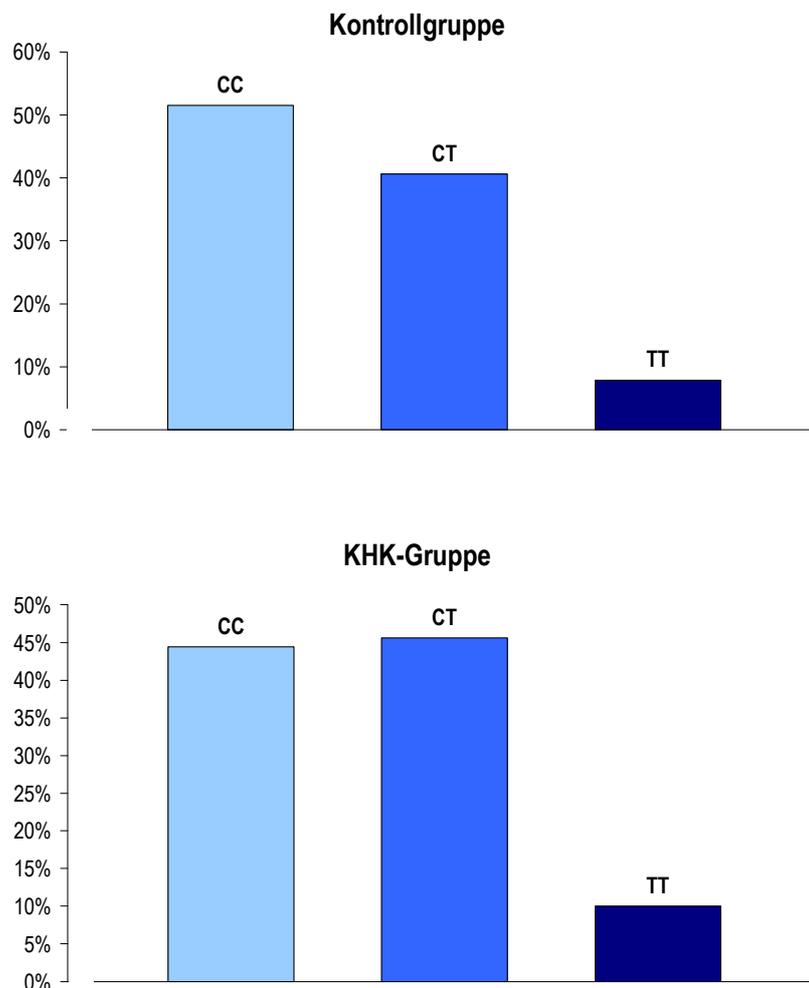


Abb 14: Genotypverteilung Kontrollgruppe und KHK-Gruppe: vergleichend dargestellt der erhöhte Anteil der T- Allel Träger in der KHK- Gruppe in Prozent

Die Genotypverteilung in der Kontrollgruppe entsprach dem Hardy-Weinberg Gesetz ($P=1,0$).

4.3 Assoziation zwischen T-Allel und KHK

Der Anteil der T825- Allel Träger war in der KHK- Gruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe (55,6% versus 48,5%; $P=0,02$). Dementsprechend wiesen T-Allel Träger ein um 33 % erhöhtes Risiko für das Auftreten einer koronaren Herzerkrankung auf (nicht angepasste OR 1,33 [95 % Konfidenz Intervall, 1,04-1,70]). Der Einfluss des T-Allels bezüglich des Auftretens von koronarer Herzerkrankung wurde in einer multivariaten Analyse unter Berücksichtigung der koronaren Risikofaktoren bestimmt. Als Risikofaktor zählten Alter, Geschlecht, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Zigarettenrauchen, Lipid Status und der BMI (siehe Tabelle 4). Der angepasste OR beträgt 1,37 [95 % Konfidenz Intervall, 1,06-1,76].

Wir untersuchten ebenfalls, ob sich ein Zusammenhang zwischen dem T- Allel und dem Schweregrad der koronaren Herzerkrankung nachweisen lässt.

Wie Tabelle 5 darstellt, zeigte sich eine deutliche Assoziation von T- Allel Trägerschaft mit der Anzahl der erkrankten Gefäße und somit dem Schweregrad der koronaren Herzerkrankung ($P=0,004$ χ^2 - Test; $P=0,006$ Trendtest).

Wie Abbildung 15 zeigt, waren dementsprechend prozentual die meisten T-Allel Träger in der Patientengruppe mit einer 3-Gefäßerkrankung zu finden (nicht angepasste OR 1,47 [95 % Konfidenz Intervall, 1,10-1,96]).

Um einen unabhängig von anderen Faktoren existierenden Zusammenhang zwischen T- Trägerschaft und dem Schweregrad der KHK nachweisen zu können, ist unter Berücksichtigung der in Tabelle 4

genannten Risikofaktoren ein „Ordinal Logistic Regression“ Modell berechnet worden. Dieses Modell bestätigte die unabhängige Assoziation zwischen T- Allel Trägerschaft und dem Schweregrad der koronaren Herzerkrankung (P= 0,003).

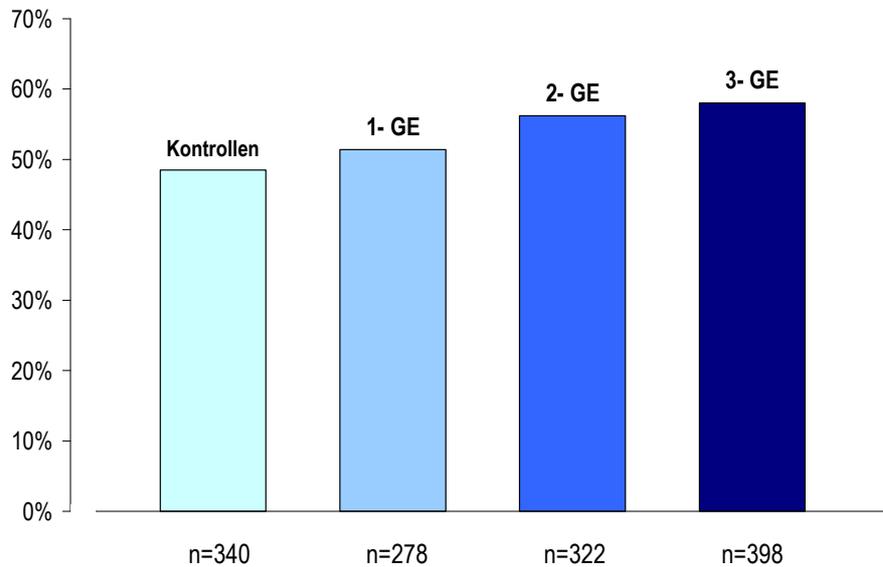


Abb 15: prozentuale Verteilung der T-Allel Träger: in der Kontrollgruppe und in den Gruppen mit 1-Gefäßkrankung (1-GE) , 2-Gefäßkrankung (2-GE) und 3-Gefäßkrankung (3-GE)

So lässt sich sagen, dass T-Allel Träger nicht nur vermehrt an koronarer Herzerkrankung leiden, sondern sogar meist an einer besonders schweren Form der KHK erkranken.

	Kontrollgruppe n= 340	1- GE n= 278	2- GE n= 322	3- GE n= 398	P
Genotyp					0,12
CC	175 (51,5)	135 (48,6)	141 (43,8)	167 (42,0)	
CT	138 (40,6)	121 (43,5)	150 (46,6)	184 (46,2)	
TT	27 (7,9)	22 (7,9)	31 (9,6)	47 (11,8)	
T-Träger	165 (48,5)	143 (51,4)	181 (56,2)	231 (58,0)	0,04 ^a / 0,006 ^b
fT	0,282	0,297	0,329	0,349	0,03 ^a / 0,003 ^b
Alter (in Jahren)	63,4±10,3	63,6±10,3	63,8±10,7	66,7±9,3	<0,0001
BMI (kg/m²)	26,6±3,2	27,0±3,3	27,2±3,8	27,2±3,5	<0,01

Tabelle 5: Der C825T Polymorphismus und der Schweregrad der Erkrankung: fT entspricht der T- Allel Frequenz, in Klammern angegebene Werte entsprechen Prozent (GE = Gefäßkrankung), ^a χ^2 - Test, ^b Trendtest

Im Rahmen dieser Arbeit untersuchten wir ebenso den Zusammenhang des GNB3 C825T

Polymorphismus mit Diabetes mellitus, arterieller Hypertonie und dem BMI in unserer

Studienpopulation (n=1338).

In der Gruppe mit arterieller Hypertonie zeigte sich folgende Genotypverteilung CC 47,1%, CT 43,3%,

TT 9,6%. Die Genotypverteilung unterschied sich somit nicht signifikant von der Genotypverteilung der

normotonen Patienten CC 44,2%, CT 46,6%, TT 9,2%, P=0,52.

Ein ähnliches Resultat zeigte sich bei den Patienten mit Diabetes mellitus. Genotypverteilung Diabetiker

CC 43,3%, CT 46,4%, TT 9,3% vs Patienten ohne Diabetes mellitus CC 46,6%, CT 43,9%, TT 9,5%,

P=0,77.

Auch der BMI zeigte keine Assoziation zur der T- Allel Trägerschaft. Der BMI beim Genotyp CC betrug

$27,0 \pm 3,7$ kg/m², bei Genotyp CT $27,0 \pm 3,4$ kg/m² und bei Genotyp TT $27,1 \pm 3,9$ kg/m², P=0,88.

Somit konnten wir in unserer Untersuchung keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den T- Allel Trägern und der Kontrollgruppe in Hinsicht auf die genannten Risikofaktoren feststellen.

5 Diskussion

5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Nach Untersuchung und Auswertung des GNB3 C825T Polymorphismus zeigte sich ein starker

Zusammenhang zwischen dem Vorkommen des T-Allels und dem Risiko an einer KHK zu erkranken. T-

Allel Träger hatten ein um 37% erhöhtes Risiko für das Auftreten einer koronaren Herzerkrankung.

Dieses überhöhte Risiko beruht vor allem auf einer Assoziation zwischen T- Allel Trägerschaft und

Mehrgefäßerkrankungen. Die untersuchte KHK-Gruppe umfasste 998 Patienten mit angiographisch

dokumentierter koronarer Herzerkrankung. Die Kontrollgruppe setzte sich aus 340 Patienten zusammen, bei welchen angiographisch eine koronare Herzerkrankung ausgeschlossen worden war.

5.2 Der GNB3 C825T Polymorphismus und koronare Herzerkrankung

In einer 1998 als Kongressmitteilung veröffentlichten Untersuchung aus der Arbeitsgruppe von Professor Siffert (Institut für Pharmakologie Universitätsklinikum Essen), die sich ebenfalls mit dem C825T Polymorphismus als Risikofaktor für KHK und Myokardinfarkt befasste, zeigte ähnliche Ergebnisse wie unsere Studie. Untersucht wurden 617 Patienten mit angiographisch dokumentierter KHK. Die Genotypbestimmung erfolgte mittels PCR und Restriktionsenzymverdau. Als Kontrolle dienten herzgesunde, in Bezug auf Alter und Geschlecht auf die KHK-Gruppe abgestimmte Patienten. T- Allel Träger hatten ein erhöhtes Risiko für das Auftreten einer KHK (OR 1,33; P=0,04). Ähnliche Daten wurden auch bei der Frage nach T- Allel Trägerschaft und dem Schweregrad der KHK erhoben. Die Arbeitsgruppe von Professor Siffert fand für die Assoziation zwischen T- Allel Trägerschaft und 3-Gefäßerkrankung einen OR von 2,15 (P=0,004). Ebenfalls erhöht war in dieser Arbeit der Anteil an T- Allel Trägern bei Patienten, die schon einen Myokardinfarkt erlitten hatten (OR 2,16; P=0,03). Das Risiko an einer KHK zu erkranken und einen Myokardinfarkt zu erleiden war bei T- Allel Trägern zweifach erhöht [26, S.2074]. In unserer Studie hatten T- Allel Träger ein um 33% erhöhtes Risiko für das Auftreten einer KHK (OR 1,33 [95% Konfidenzintervall 1,04-1,70]). Für die Assoziation zwischen T- Allel Trägerschaft und 3-Gefäßerkrankungen fanden wir einen OR von 1,47 [95% Konfidenzintervall 1,10-1,96].

In einer anderen Studie, die postuliert, die genetische Ursache einen Myokardinfarkt zu erleiden sei polygenetisch bedingt, zeigte sich eine positive Assoziation zwischen T-Allel Trägerschaft und Myokardinfarkt. Als weiterer Faktor wurde der ACE Deletion/Insertion (D/I) Polymorphismus

miteinbezogen, welcher ebenfalls als genetische Ursache für KHK identifiziert wurde. Untersucht wurden 585 Patienten mit angiographisch dokumentierter KHK, wovon 270 noch keinen und 315 schon einen Myokardinfarkt erlitten hatten. Bei Individuen mit dem ACE Genotyp II war die T- Allel Trägerschaft nicht mit einem erhöhten Myokardinfarktrisiko assoziiert (OR 0,5; P=0,09). Bei Individuen mit den ACE Genotypen DI und DD war die T- Allel Trägerschaft mit einem moderat erhöhten Myokardinfarktrisiko assoziiert (OR 1,9; P=0,01 und OR 2,4; P=0,02). Das höchste Risiko für das Auftreten eines Myokardinfarktes hatten homozygote T- Allel Träger, die gleichzeitig den ACE Genotyp DD aufwiesen (OR 7,5; P=0,006) [24, S.986-988].

Im Rahmen der ECTIM Studie konnte das Risiko, einen Myokardinfarkt zu erleiden, nicht mit einem vermehrten Vorkommen des T-Alles in Zusammenhang gebracht werden. Untersucht wurden 564 Patienten (Kontrollgruppe n= 633). Das Patientenkollektiv war in zwei Gruppen aufgeteilt: Nord Irland 171 Patienten (Kontrollen n=163) und Frankreich 393 Patienten (Kontrollen n=470). Wie Tabelle 6 zeigt trug in diesem Fall die T-Allel Trägerschaft nicht zu einem gehäuften Auftreten von Myokardinfarkten bei (ECTIM: OR 1,11 [95% Konfidenzintervall 0,88-1,39] P= 0,37) [5, S.1176].

	T- Allel Frequenz		P- Werte
	Myokardinfarkt	Kontrollen	
Nord Irland	0,31	0,30	0,79
Frankreich	0,33	0,31	0,30

Tabelle 6: Ergebnisse der ECTIM Studie: T- Allel Frequenz der untersuchten Patienten- und Kontrollgruppen, der in Belfast und Frankreich durchgeführten Studie

Klitschar et al untersuchten in ihrer Arbeitsgruppe Patienten, die an einem akuten Myokardinfarkt verstorben waren, post mortem nach. Untersucht wurde, ob ein erhöhter Anteil an GNB3 825T Trägern in dieser Gruppe zu finden war. Das Studienkollektiv, die Myokardinfarktgruppe, setzte sich aus 116 Personen (78 Männer, 38 Frauen), die Kontrollgruppe aus 137 Personen (52 Männer, 85 Frauen)

zusammen. Bei der deutlich divergierenden Geschlechterverteilung in der Kontrollgruppe und der Myokardinfarktgruppe zeigte sich als Endresultat einzig ein signifikant erhöhter Anteil des Genotyp TT bei den Frauen, die an einem Myokardinfarkt verstorben waren ($P=0,029$) [19, S.143-144].

Ein Zusammenhang zwischen dem GNB3 C825T Polymorphismus und Restenose sowie Thrombose nach koronarer Stentimplantation konnte durch unsere Arbeitsgruppe nicht nachgewiesen werden [2, S.153].

5.3 Der G β 3 C825T Polymorphismus und arterielle Hypertonie

Eine Assoziation zwischen T-Allel Trägerschaft und Hypertonie ist in zahlreichen Studien nachgewiesen worden [4, S.1096; 32, S.512; 37, S.47], wenn sie auch nicht bei allen Bevölkerungsgruppen auftritt [14, S.688; 18, S.142], beziehungsweise nicht in allen entsprechenden Studien reproduzierbar war [5, S176].

In ihrer initialen Studie bestimmten Siffert et al den GNB3 C825T Genotyp bei 426 Patienten mit erhöhten Blutdruckwerten (systolisch: $159,5 \pm 21,8$ mmHg; diastolisch: $99,1 \pm 14,1$ mmHg) und bei 427 Individuen mit normalen Blutdruckwerten (systolisch: $113,7 \pm 7,0$ mmHg; diastolisch: $72,1 \pm 6,2$ mmHg). Der Anteil von T- Allel Trägern in der Gruppe mit erhöhten Blutdruckwerten war 53,1 % und 44% bei den Individuen mit normalen Blutdruckwerten. Somit hatten T- Allel Träger mit einem OR von 1,44 ([95% Konfidenzintervall 1,09-1,88] $P=0,025$) ein deutlich erhöhtes Risiko für arterielle Hypertonie (TT versus CC OR 1,79 [95% Konfidenzintervall 1,05-3,05] $P=0,03$; TC versus CC OR 1,38 [95% Konfidenzintervall 1,04-1,83] $P=0,025$) [37, S. 47].

Eine Fall-Kontroll-Studie 110 hypertensiver Australier kaukasischen Ursprungs mit positiver Familienanamnese für arterielle Hypertonie (beide Elternteile waren ebenfalls an arterieller Hypertonie erkrankt) und 189 Individuen mit normalen Blutdruckwerten und normotonen Eltern untersuchte auch

die Assoziation von T- Allel Trägerschaft und arterieller Hypertonie. Die Genotypbestimmung erfolgte durch PCR und Restriktionsenzymverdau. In der Gruppe der Individuen mit arterieller Hypertonie betrug die T- Allel Frequenz 0,43, in der Kontrollgruppe 0,25 (OR 2,3 [95% Konfidenzintervall 1,7-3,3] P= 0,00002) [4, S.1094]. Dementsprechend ist T- Allel Trägerschaft bei Individuen mit positiver Familienanamnese als Risikofaktor für arterielle Hypertonie zu werten.

Bestätigt wurden die Assoziation zwischen T- Allel Trägerschaft und arterieller Hypertonie durch eine Studie an der 608 Patienten des WHO-MONIKA Kollektivs (World Health Organisation-Multinational Monitoring of Trends and Determinants in Cardiovascular Disease) teilnahmen. Bei Individuen ohne Blutdruckmedikation zeigte sich eine moderate Assoziation von T- Trägerschaft mit erhöhten diastolische Blutdruckwerten (CC 88,6±0,3 mmHg; CT 90,1±0,7 mmHg; TT 91,8±1,7 mmHg; P= 0,02), nicht aber mit erhöhten systolischen Werten. Bei Individuen mit antihypertensiver Therapie zeigte sich zudem der Genotyp TT 1,8-mal häufiger als der Genotyp CC [32, S.512-513].

Eine primäre Assoziation zwischen GNB3 825T und Hypertonie konnte in der von Sartori et al durchgeführten Studie nicht nachgewiesen werden. Es wurden 461 junge hypertensive Patienten (Grad I Hypertonie: systolische Blutdruckwerte 140-159 mmHg, diastolische Blutdruckwerte 90-99 mmHg) im Alter von 18 – 45 Jahren genotypisiert. Die Genotypverteilung der untersuchten, bezüglich Alter, Geschlecht und BMI aufeinander abgestimmten Patienten zeigte keine statistisch signifikante Assoziation (CC 47,9%, CT 44,5%, TT 7,6%) bezüglich T- Allel Trägerschaft und dem Vorkommen einer Hypertonie [31, S.912]. In weiteren Nachuntersuchungen im Verlauf von 2 Jahren zeigte sich zwar eine Tendenz der T- Allel Träger eine Grad II Hypertonie (systolische Blutdruckwerte \geq 160 mmHg, diastolische Blutdruckwerte \geq 100 mmHg) zu entwickeln, diese war jedoch statistisch nicht signifikant (Genotypverteilung: CC 51,1%, TC 61,5%, TT 54,3%) [31, S.913].

Auch Brand et al fanden keine signifikante Assoziation zwischen dem GNB3 C825T Polymorphismus und dem vermehrten Auftreten von arterieller Hypertonie. Untersucht wurden 681 Individuen mit arterieller Hypertonie, die Kontrollgruppe bestand aus 308 Individuen. Die Genotypverteilung in der Gruppe mit arterieller Hypertonie verglichen mit der Gruppe ohne arterielle Hypertonie zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied. Der OR für die Assoziation von T- Allel Trägerschaft mit arterieller Hypertonie war 1,23 ([95% Konfidenzintervall 0,94-1,62] P= 0,13). Das Durchschnittsalter der untersuchten Individuen betrug im Mittel $48,0 \pm 8,9$ Jahre. Brandt et al postulieren, dass gerade bei jüngeren Patienten der genetische Einfluss des GNB3 C825T Polymorphismus eine arterielle Hypertonie zu erleiden, nachzuweisen sein müsste [5, S.1175].

5.4 Der GNB3 C825T Polymorphismus und BMI

Die Arbeitsgruppe von Professor Siffert fand in einem Kollektiv von Hypertonikern eine starke Akkumulation des 825T- Allels bei adipösen Patienten mit einem BMI $> 29,9 \text{ kg/m}^2$, aber auch bei normotensiven jungen Männern kaukasischen Ursprungs. Das Adipositas Risiko des Genotyps TT war gegenüber dem Genotyp CC um das zwei- bis dreifache erhöht (Hypertonikerkollektiv BMI $>29,9$ versus BMI <25 : OR TT/CC = 4,3 [95% Konfidenzintervall 1,2-16]; P= 0,02; normotensiven Individuen: T- Allel Frequenz BMI $> 27 \text{ kg/m}^2$ 48%, BMI $\leq 25 \text{ kg/m}^2$ 38%)[36, S.31].

Bei weiteren untersuchten Bevölkerungsgruppen (Chinesen und Schwarzafrikaner) wurde eine Assoziation zwischen der T-Allel Trägerschaft und Adipositas gefunden. Interessanterweise zeigte sich bei der vergleichenden Untersuchung der ländlichen Bevölkerung Zimbabwes mit der in der Stadt lebenden zwar eine identische Genotypverteilung, nur aber bei den Individuen aus der Stadt zeigte sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen erhöhtem BMI und der T- Allel Trägerschaft. Zurückgeführt wurde dieses Phänomen auf den westlicheren Lebensstil in der Stadt, mit einer dementsprechend

erhöhten Kalorienzufuhr und einer verminderten körperlichen Aktivität als Beispiel einer Gen- Umwelt Interaktion (erhöhtes Risiko nur bei Bewegungsarmut). Die T- Allel Frequenz der ländliche Bevölkerung mit einem BMI > 25 kg/m² betrug 82,1%, bei einem BMI < 25 kg/m² 79,2%; P< 0,05. Bei dem in der Stadt lebenden Kollektiv zeigte sich eine T- Allel Frequenz bei einem BMI > 25 kg/m² von 85%, bei einem BMI < 25 kg/m² eine Frequenz von 80,6%; P< 0,05 [35, S.1925].

In einer Studie von Benjafeld et al wurde ebenso der Zusammenhang des GNB3 C825 Polymorphismus und Adipositas untersucht. Das Patientenkollektiv wurde in drei Gruppen unterteilt. Gruppe i: Individuen mit morbidier Adipositas (BMI 43±8 kg/m²), als Kontrollgruppe dienten Individuen mit einem BMI < 30 kg/m²

Gruppe ii: Normotone, adipöse Patienten, BMI 29±5 kg/m², die Kontrollgruppe setzte sich aus normotonen Individuen mit einem BMI < 25 kg/m² zusammen

Gruppe iii: Adipöse Patienten mit arterieller Hypertonie, BMI 30±4 kg/m² und der hypertonen Kontrollgruppe, BMI 23±2 kg/m²

Bei den untersuchten adipösen Individuen zeigte sich eine erhöhte T- Allel Frequenz, diese war jedoch nicht statistisch signifikant (T- Allel Frequenz Gruppe i 12%, Gruppe ii 17%, Gruppe iii 28%) [3, S.778-779].

Wir untersuchten ebenfalls, ob es eine Assoziation zwischen dem GNB3 C825T Polymorphismus und kardiovaskulären Risikofaktoren wie Hypertonie, Diabetes mellitus oder Adipositas gibt. In unseren Ergebnissen konnte dies jedoch nicht bestätigt werden.

Es zeigte sich zwar eine Tendenz für eine Assoziation zwischen T- Allel Trägerschaft und arterieller Hypertonie und Diabetes mellitus, jedoch ohne statistische Signifikanz. Somit gehen wir für unsere Studie von einem von den Risikofaktoren unabhängigen Zusammenhang zwischen T- Allel und dem

vermehrten Auftreten von KHK aus. Welchem Mechanismus im Detail allerdings der Zusammenhang zwischen T- Allel und KHK in unserer Studie unterliegt, ist noch zu untersuchen.

5.5 Der GNB3 C825T Polymorphismus und Arteriosklerose sowie Vasokonstriktion

Die Arteriosklerose ist für das Entstehen einer koronaren Herzerkrankung verantwortlich. Entgegen der bekannten Vorstellung, dass sich einfach ein Überfluss an vor allem LDL an den Arterienwänden absetzt und mit der Zeit das Lumen verengt, sind es jedoch auch Entzündungsfaktoren wie Monozyten, Makrophagen und T-Zellen, die für die Erstmanifestation der Arteriosklerose verantwortlich sind [9, S.115]. In vitro wurde, in einer Studie von Lindemann et al, nach Interleukin 2 Stimulus bei homozygoten 825T-Trägern, Genotyp TT, eine 2-4mal stärkere T-Zell Proliferation als bei homozygoten C-Allel Trägern, Genotyp CC, gefunden ($P < 0,05$) [21, S.83].

Viedt et al fanden nach Stimulation von glatten Gefäßmuskelzellen mit dem Lysekomplex des Komplementsystems (C5b-9) eine erhöhte Transkription und Produktion des proinflammatorischen Interleukin-6. Die Interleukin-6 Ausschüttung ist wohl G_i - Protein abhängig, da sie sich durch Pertussistoxin hemmen lässt. Ob die T- Allel Trägerschaft signifikant zu einer vermehrten Interleukin-6 Produktion und Ausschüttung führt wurde in dieser Arbeit nicht gesondert behandelt [41, S.2371].

Plättchenaktivierung und Plättchenadhäsion sind pathophysiologisch ebenso ein wichtiger Bestandteil der Arteriosklerose. Naber et al untersuchten gesunde, nicht rauchende, männliche Individuen im Alter zwischen 18 und 40. Untersucht wurden 16 Individuen mit dem Genotyp TT oder CT und 18 Individuen mit dem Genotyp CC. Bei T- Allel Trägern zeigte sich eine signifikant gesteigerte Plättchenaggregation nach Epinephringabe ($P = < 0,05$) [25, S.200].

Die Mechanismen, die zu einer koronaren Vasokonstriktion führen, sind zum Teil dieselben, die zur Entwicklung einer KHK führen. Der koronare Blutfluss wird unter anderem über α_1 - und α_2 - Rezeptoren geregelt, respektive wird die Verminderung des Blutflusses durch Vasokonstriktion hauptsächlich über α_2 - Rezeptoren reguliert. α_2 -Rezeptoren sind im Gegensatz zu α_1 - Rezeptoren G_i gekoppelt. Baumgart et al genotypisierten 48 Individuen, jeweils 12 Individuen erhielten entweder den α_1 - Rezeptoren Agonisten Methoxamin oder den α_2 -Rezeptor Agonisten BHT- 933. Pectanginöse Beschwerden oder ST- Strecken Veränderung von 0,2 mV im EKG 10 Minuten nach Methoxamin- oder BHT- Gabe stellten die Parameter für eine relevante Reduktion des koronaren Blutflusses dar. Nach Methoxamingabe zeigte sich kein relevanter Unterschied der T- Allel Träger gegenüber den Nichtträgern. Nach BHT 933 Gabe reduzierte sich der koronare Blutfluß in Abhängigkeit vom Genotyp (T- Allel Träger $58\pm 4\%$, Genotyp CC $28\pm 4\%$; $P= 0,001$) [1, S.697].

Meirhaeghe et al untersuchten bei 131 Individuen koronarangiographisch die Vasokonstriktion nach Methyl-Ergonovin Maleat Gabe sowie die Vasodilatation nach Isorbiddinrat Gabe. Nach 3 Minuten zeigten T-Allel Träger eine um 68% stärkere Vasokonstriktion als Individuen mit dem Genotyp CC (TT, CT – 9,8%; CC – 5,8%; $P=0,028$). Die Vasodilatation unterlag keinem Einfluss des Genotyps [22, S.846].

Zusammenfassend ist deutlich geworden, welche große Rolle der GNB3 C825T Polymorphismus in unserem Körper spielt. Viele Signalwege der Zellen sind G-Protein gekoppelt, also auch durch dessen erhöhte Aktivierbarkeit beeinflusst. Die erwähnten kardiovaskulären Risikofaktoren und Pathomechanismen werden durch diesen Polymorphismus verstärkt und unterstreichen seine Rolle in der Entwicklung der KHK.

Man muss jedoch davon ausgehen, dass die erhöhte Wahrscheinlichkeit, als T-Allel Träger an koronarer Herzkrankheit zu erkranken, nicht nur auf den vermehrt vorkommenden Risikofaktoren

beruht, sondern vielmehr lässt sich das Ergebnis dieser Studie durch einen direkten Zusammenhang erklären. Bei unseren Untersuchungen konnte ein von den Risikofaktoren unabhängiger Zusammenhang dargestellt werden, wir erhielten keine statistisch signifikante Assoziation zwischen T-Allel Trägerschaft und zum Beispiel arterieller Hypertonie oder Adipositas. Das erhöhte Risiko der T-Allel Träger für das Auftreten einer koronaren Herzerkrankung beruhte vor allem auf einer Assoziation zwischen T-Allel Trägerschaft und Mehrgefäßerkrankungen.

5.6 Zukunftsperspektiven

Polymorphe Basenpaare sind nicht nur wie, bereits beschrieben mit ursächlich für die KHK und ihre Risikofaktoren. Unzählige weitere Krankheiten lassen sich zum Teil auf genetische Ursachen zurückführen. Durch Analyse der genetischen Ursachen dieser Krankheiten hat eine in den letzten Jahren entwickelte Technologie, die DNA-Chips oder Microarrays, einen neuen Trend gesetzt [43, S.36]. Mit Hilfe dieser Chips lässt sich eine gewaltige genetische Datenmenge in Einem erheben. Ein weiteres Anwendungsgebiet der DNA-Chips stellt die Onkologie mit molekularen Tumormarkern für die Tumorentstehung, das Tumorwachstum und den Therapieerfolg dar [29, S.211].

Aber auch in der Pharmakologie wird zunehmend mit Microarrays gearbeitet. Träger bestimmter genetischer Merkmale zeigen unterschiedliche Therapieeffekte auf Medikamente [17, S.47]. Alle Medikamente unterliegen demselben Weg in unserem Körper: Resorption, Verteilung, Metabolisierung, Ausscheidung. Ein Schlüsselenzym der Metabolisierung ist Cytochrom P 450 mit seinen Isoenzymen. Ein das Cytochrom P 450 betreffender Polymorphismus des CYP2C9 ist für die Metabolisierung von Marcumar verantwortlich. Träger der Allele CYP2C9*2, CYP2C9*3 führen bei gleicher Dosierung zu einer deutlich erhöhten Blutungsneigung unter Marcumartherapie als Nichtträger. Dementsprechend sollte bei den Trägern dieses Alles die Dosierung reduziert werden [17, S.52].

Das technische Grundprinzip der DNA-Chips beruht auf der komplementären DNA-Anlagerung an einem Einzelstrang, die Microarrays werden mit DNA-Einzelsträngen einzelner Gene beladen und stehen dann zur Analyse bereit. Eine technische Schwierigkeit stellt noch das Beladen der Microarrays dar, so gibt es derzeit mehrere konkurrierende Verfahren hierzu [43, S.37]. Grundsätzlich lässt sich jeder Chip individuell mit ausgewählten Genen für bestimmte Fragestellungen beladen, jedoch werden auch industriell gefertigte Chips mit bestimmten Genmustern angeboten. Ein Microarray der Firma Affymetrix kann derzeit mit bis zu 1000000 SNPs beladen werden. Die PCR sowie die Amplifikation der Gene mit den benötigten allelspezifischen fluoreszierenden Primern und Sonden werden dann in einem Schritt direkt auf den Arrays durchgeführt [16, S.26]. Die Ergebnisse werden nach dem Scannen der Arrays entsprechend ausgewertet [27, S.918; 43, S.38].

Eine breitenmedizinische Anwendung ist zu diesem Zeitpunkt noch nicht vorhanden. Der technisch aufwendige und komplizierte Vorgang der Chip-Produktion und auch der Kostenfaktor sind hier noch limitierend. Es bleibt jedoch zu erwarten, dass innerhalb der nächsten Jahre die DNA-Chips zunehmend ihre Stellung verteidigen werden und ein Screening der Patienten bezüglich der bedeutendsten Polymorphismen möglich sein wird.

6 Zusammenfassung

G-Proteine sind im Körper ubiquitär vorkommende Proteine, die an der zellulären Regulation etlicher Prozesse wie Hormonsekretion oder Muskelkontraktion beteiligt sind [10, S.118]. G-Proteine bestehen aus drei Untereinheiten, der α -, β - und der γ -Untereinheit. Sie lassen sich nach strukturellen Ähnlichkeiten der α -Untereinheit in mehrere Familien unterteilen: G_s , G_i , G_q , $G_{12/13}$ [42, S.1163].

In Mitteleuropa weisen circa 30 Prozent der Bevölkerung einen Polymorphismus der β_3 Untereinheit des G_i -Proteins auf, welcher zu einer Verstärkung der G_i vermittelten transmembranären Signaltransduktion führt [1, S.965; 35, S.1925; 36, S.28]. Hierbei wird auf Exon 10 in Position 825 Cytosin durch Thymidin ersetzt [34, S.1302]. Dies bewirkt bei unveränderter Aminosäuresequenz ein alternatives Spleißen des Gens mit dem Verlust der Nukleotide 498-620 auf Exon 9 [37, S.45].

In dieser Studie untersuchten wir, ob es eine Assoziation des GNB3 C825T Polymorphismus mit dem erhöhten Risiko, an einer koronaren Herzerkrankung zu erkranken und dem Schweregrad der KHK gibt.

Untersucht wurden 998 konsekutive Patienten mit angiographisch gesicherter KHK (Stenose > 50%), ohne Hinweis auf einen akuten oder abgelaufenen Myokardinfarkt. Die Kontrollgruppe bestand aus 340 bezüglich Alter und Geschlecht in etwa vergleichbaren, herzgesunden Personen, bei welchen angiographisch Koronararterienstenosen ausgeschlossen wurden und kein Hinweis auf einen akuten oder abgelaufenen Myokardinfarkt erbracht werden konnte. Nach Extraktion der DNA wurde der Genotyp mittels PCR unter Verwendung allelspezifischer fluorogener Sonden bestimmt.

Bei Auswertung der Ergebnisse waren die kardiovaskulären Risikofaktoren (Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie, Zigarettenrauchen) bei der KHK Gruppe häufiger vertreten, auch der durchschnittliche BMI war, verglichen mit der Kontrollgruppe, erhöht.

Der Anteil der T- Allel Träger war in der KHK Gruppe, verglichen mit der Kontrollgruppe signifikant erhöht (55,6% versus 48,5%; $P=0,02$). Der angepasste OR unter Berücksichtigung der koronaren Risikofaktoren betrug für die KHK- Gruppe 1,37 [95% Konfidenz Intervall, 1,06-1,76].

Des Weiteren zeigte sich eine Assoziation zwischen T- Allel Trägerschaft und dem Schweregrad der KHK. Bei 2- oder 3- Gefäßkrankungen war der Anteil der T- Allel Träger signifikant erhöht ($P=0,006$; Trendtest). Die stärkste Assoziation zeigte sich zwischen T- Allel Trägern und 3- Gefäßkrankung; der nicht angepasste OR betrug hier 1,47 [95% Konfidenz Intervall, 1,10-1,96].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass T-Allel Trägerschaft das Risiko, an einer koronaren Herzerkrankung zu erkranken, um 37% erhöht. Aber auch der Schweregrad der KHK wird durch das T- Allel mitbestimmt.

7 Literaturverzeichnis

- (1) Baumgart D, Naber C, Haude M, Oldenburg O, Erbel R, Heusch G, Siffert W.
G- Protein beta 3 subunit 825T allele and enhanced coronary vasokonstriction on α^2 -adrenoceptor aktivation.
Circ Res. 85 (1999): 965-969
- (2) von Beckerath N, Kastrati A, Koch W, Böttiger C, Mehilli J, Seyfarth M, Schömig A.
G Protein beta 3 subunit polymorphism and risk of thrombosis and restenosis following coronary stent placement.
Atherosclerosis. 149 (2000): 151-155
- (3) Benjafield AV, Lin RCY, Dalziel B, Gosby AK, Caterson ID, Morris BJ.
G-protein $\beta 3$ subunit gene splice variant in obesity and overweight.
Int J Obes Relat Metab Disord. 25 (2001): 777-80
- (4) Benjafield AV, Jeyasingam CL, Nyholt DR, Griffiths LR, Morris BJ.
G-protein beta3 subunit gene (GNB3) variant in causation of essential hypertension.
Hypertension. 32 (1998): 1094-7
- (5) Brand E, Herrmann SM, Nicaud V, Ruidavets JB, Evans A, Arveiler D, Luc G, Plouin PF, Tiret L, Cambin F.
The 825C/T polymorphism of the G- protein subunit beta3 is not related to hypertension.
Hypertension. 33 (1999): 1175-1178
- (6) Brass L, Hoxie J, Manning D.
Signaling through G Proteins and G protein-coupled Receptors during Platelet Activation.
J Thromb Haemost 70 (1993): 217-223

- (7) Clapham DE, Neer EJ.
G protein $\beta\gamma$ subunits.
Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol. 37 (1997): 167-203
- (8) Deutsche Gesellschaft für Kardiologie
Leitlinien Koronare Herzkrankheit
Z.Kardiol. 87 (1998): 907-911
- (9) Epstein F.
Atherosclerosis- An Inflammatory Disease.
N Engl J Med 340 (1999): 115-124
- (10) Forth W, Starke K.
G- Protein gekoppelte Rezeptoren.
In: „Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie“
Forth W, Henschler D, Rummel W, Förstermann U, Starke K (Hrsg.). Urban und Fischer
Verlag
München-Jena, 2001; 8. Auflage; 117-120.
- (11) Frey UH, Aral N, Muller N, Siffert W.
Cooperative effect of GNB3 825C >T and GPII(A) polymorphisms in enhanced platelet
aggregation.
Thromb Res. 109 (2003): 279-286

- (12) Grossmann M, Dobrev D, Siffert W, Kirch W.
Heterogeneity in hand veins responses to acetylcholine is not associated with polymorphisms in the G-protein β s-subunit (C825T) and endothelial nitric oxide synthase (G894T) genes but with serum low density lipoprotein cholesterol.
Pharmacogenetics 11(2001): 307-316
- (13) Guttersohn A, Naber C, Müller N, Erbel R, Siffert W.
G protein β 3 subunit 825 TT genotype and post-pregnancy weight retention.
Lancet. 355 (2000): 1240-1241
- (14) Hegele RA, Harris AJ, Cao H, Zinman B.
G protein beta3 subunit gene variant and blood pressure variation in Canadian Oji-Cree.
Hypertension. 32 (1998): 688-692
- (15) Herold, G.
Koronare Herzerkrankung.
In: „Innere Medizin“.
Herold G (Hrsg.)
August Haas Strasse, Köln, 2001;187-196
- (16) Huber M, Mündlein A, Dornstauder E, Schneeberger C, Tempfer CB, Mueller MW, Schmidt WM.
Accessing single nucleide polymorphisms in genomic DNA by direct multiplex polymerase chain reaction amplification on oligonucleotide microarrays.
Anal Biochem. 303 (2002): 25-33

- (17) Huijun Z Ring, Deanna L Kroetz.
Candidate gene approach for pharmacogenetic studies.
Pharmacogenomics.2002; 3: 47-56
- (18) Ishikawa K, Imai Y, Katsuya T, Ohkubo T, Tsuji I, Nagai K, Takami S, Nakata Y, Satoh H, Hisamichi S, Higaki J, Ogihara T.
Human G-Protein beta3 subunit variant is associated with serum potassium and total cholesterol levels but not with blood pressure.
Am J Hypertens. 13 (2000): 140-145
- (19) Klintschar M, Stiller D, Schwaiger P, Kleiber M.
DNA polymorphisms in the tyrosin hydroxylase and GNB 3 Genes: association with unexpected death from acute myocardial infarction and increased heart weight.
Forensic Sci Int. 153 (2005): 142-146
- (20) Li D, Roberts R.
WD-repeat proteins: structure characteristics, biological function, and their involvement in human diseases.
Cell Mol Life Sci. 58 (2001): 2085-2097
- (21) Lindemann M, Virchow S, Ramann F.
The G protein β 3 subunit 825T allele is a genetic marker for enhanced T cell response.
FEBS Lett. 495 (2001): 82-86

- (22) Meirhaeghe A, Bauters C, Helbecque N, Hamon M, McFadden E, Lablanche JM, Bertrand M, Amouyel P.
The human G-protein beta3 subunit C825T polymorphism is associated with coronary artery vasoconstriction.
Eur Heart J. 22 (2001): 845-848
- (23) Meyer J, Breithardt G, Erbel R, Erdmann E, Gohlke H, Hanrath P, Sonntag F, Steinbeck G.
Leitlinie: Koronare Herzkrankheit / Angina pectoris. Deutsche Gesellschaft für Kardiologie
(<http://www.dgk.org/leitlinien/leitlinienKoronareHerzkrankheit.pdf>) Stand:31.03.2008
- (24) Naber C, Hüsing J, Wolfhard U, Erbel R, Siffert W.
Interaction of the ACE D Allele and the GNB3 825T Allele in myocardial infarction.
Hypertension. 36 (2000): 986-989
- (25) Naber C, Herrmann BL, Vietzke D, Altmann C, Haude M, Mann K, Roskopf D, Siffert W.
Enhanced epinephrine-induced platelet aggregation in individuals carrying the G protein beta3 subunit 825T allele.
FEBS Lett. 484 (2000): 199-201
- (26) Naber C, Bickeboeller H, Mueller N, Siffert W.
Genetic variability of G protein reactivity as a risk factor for coronary artery disease and myocardial infarction (Abstract).
Circulation 98 (1998):I-394
- (27) Rauch A, Rüschemdorf F, Huang J, Trautmann U, Becker C, Thiel C, Jones KW, Reis A, Nürnberg P.
Molecular karyotyping using an SNP array for genomewide genotyping.
J Med Genet 41 (2004):916-922

- (28) Robishaw JD, Berlot CH.
Translating G protein subunit diversity into functional specificity.
Curr Opin Cell Biol. 16 (2004): 206-209
- (29) Ross JS, Schenkein DP, Kashala o, Linette GP, Stec J, Symmanns WF, Puzstai L,
Hortobagyi GN.
Pharmacogenomics.
Adv Anat Pathol. 11 (2004):211-220
- (30) Rosskopf D, Frey U, Eckardt S, Schmidt S, Ritz E, Hofmann S, Jacksch M, Müller N, Hüsing
J, Siffert W, Jöcke KH.
Interaction of the G Protein beta3 subunit T825 Allele and the IRS-1 Arg927 variant in type 2
diabetes.
Eur J Med Res. 5 (2000): 484-490
- (31) Sartori M, Semplicini A, Siffert W, Mormino P, Mazzer A, Pegoraro F, Mos L, Winnicki M,
Palatini P.
G- Protein β 3- subunit gene 825T allele and hypertension.
Hypertension. 42 (2003): 909-914
- (32) Schunkert H, Hense HW, Döring A, Riegger G, Siffert W.
Association between a polymorphism in the G protein β 3 subunit gene and lower renin and
elevated diastolic blood pressures levels.
Hypertension. 32 (1998): 510-513

- (33) Shcherbak NS, Schwartz EI.
The C825T polymorphism in the G-protein $\beta 3$ subunit gene and diabetic complications in IDDM patients.
J Hum Genet. 46 (2001): 188-191
- (34) Siffert W.
G protein β subunit 825T allele, Hypertension, obesity, and diabetic nephropathy.
Nephrol Dial Transplant. 15 (2000): 1298-1306
- (35) Siffert W, Forster P, Jöckel KH, Mvere DA, Brinkmann B, Naber C, Crookes R, Du P Heyns A, Epplen JT, Fridey J, Freedman BI, Müller N, Stolke D, Sharma AM, Al Moutaery K, Grosse-Wilde H, Buerbaum B, Ehrlich T, Ahmad HR, Horsthemke B, Du Toit ED, Tiilikainen A, Ge J, Wang Y, Rosskopf D, Hüsing J, Yang D.
Worldwide ethnic distribution of the G protein beta3 subunit 825T allele and its association with obesity in Caucasian, Chinese, and Black African individuals.
J Am Soc Nephrol. 10 (1999): 1921-1930.
- (36) Siffert W, Rosskopf D, Erbel R.
Genetischer Polymorphismus in der G-Protein- $\beta 3$ -Untereinheit, Adipositas und essentielle Hypertonie.
Herz 25 (2000): 26-33
- (37) Siffert W, Rosskopf D, Siffert G, Busch S, Moritz A, Erbel R, Sharma A, Ritz E, Wichmann HE, Jakobs KH, Horsthemke B.
Association of a human G-protein $\beta 3$ subunit variant with hypertension.
Nat Genet. 18 (1998): 45-48

- (38) Siffert W.
Molecular genetics of G- proteins and atherosclerosis risk.
Basic Res Cardiol. 96 (2001): 606-611
- (39) Statistisches Bundesamt; Gesundheitsberichtserstattung des Bundes; Heft 33
Koronare Herzkrankheit und akuter Myokardinfarkt
(<http://www.gbe-bund.de>) Stand: 31.03.2008
- (40) Tiago AD, Nkeh B, Candy GP, Badenhorst D, Deferios D, Brooksbank R, Neithardt M, Luker F, Milne J, Woodiwiss AJ, Norton GR.
Association study of eight candidate genes with renin status in mild-to-moderate hypertension in patients of African ancestry.
Cardiovasc J S Afr. 12 (2001): 75-80
- (41) Viedt C, Hansch GM, Brandes RP, Kübler W, Kreuzer J.
The terminal complement complex C5b-9 stimulates interleukin-6 production in human smooth muscle cells through activation of transcriptions factors NF-kappa B and AP-1.
FASEB J 14 (2000): 2370-2372
- (42) Wettschureck N, Offermanns S.
Mammalian G proteins and their cell type specific funktions.
Physiol Rev. 85 (2005): 1159-1204
- (43) Wilhelm K.
Gene, die ans Herz gehen.
Max Planck Forschung 4 (2004): 36-39
- (44) www.fccc.edu/users/rogatko/hwdiag
Stand: 04.04.2006

- (45) <http://www.med.tu-muenchen.de/de/gesundheitsversorgung/kliniken/humangenetik/glossar.php>
Stand: 01.02.2008
- (46) Zeltner R, Delles C, Schneider M, Siffert W, Schmieder RE.
G-protein β 3 subunit gene (GNB3) 825T allele is associated with enhanced renal perfusion in early hypertension.
Hypertension. 37 (2001): 882-886

8 Danksagung

Am Ende dieser Arbeit möchte ich mich zunächst bei Herrn Univ.-Prof. Dr. Albert Schömig für die Möglichkeit, diese wissenschaftliche Arbeit am Deutschen Herzzentrum München durchzuführen, bedanken.

Mein tiefster Dank gilt Herrn Priv.- Doz. Dr. Nicolas von Beckerath für die exzellente Betreuung und Unterstützung meiner wissenschaftlichen Tätigkeit sowohl in der praktischen Durchführung der Experimente wie auch bei den anschließenden Korrekturen der Doktorarbeit. Priv.- Doz. Dr. von Beckerath stand mir zu allen Zeiten geduldig mit Antworten, Ratschlägen und Verbesserungsideen zur Seite.

Während der experimentellen Phase fand ich große Unterstützung durch Angela Ehrenhaft, Wolfgang Latz und Marianne Eichinger. Für die ausgezeichnete Zusammenarbeit beim Durchführen der Experimente und für die geduldige Einarbeitung in die Methoden möchte ich mich herzlichst bedanken. An dieser Stelle sei allen Mitarbeitern des Instituts für die freundliche Unterstützung gedankt.